



**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAHRAMANMARAŞ İLİNDE ALFA TALASEMİ GENOTİPLERİ**

**PERİHAN SÜMER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2016**

**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ İLİNDE ALFA TALASEMİ GENOTİPLERİ**

**PERİHAN SÜMER**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ**

**Jüri Üyesi**  
**Doç. Dr. Ahmet ÇELİK**

**Jüri Üyesi**  
**Doç. Dr. Ali Erdiñç YALIN**

**KAHRAMANMARAŞ-2016**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Perihan SÜMER tarafından hazırlanan “Kahramanmaraş İlinde Alfa Talasemi Genotipleri ” adlı bu tez, jürimiz tarafından .... / .... / ..... tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ergül Belge Kurutaş  
KSU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

Doç. Dr. Ahmet Çelik  
KSU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

Doç. Dr. Ali Erdiñ Yalın  
Mersin Üni. Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.D.

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Perihan SÜMER



Bu çalışma KSU Bilimsel Araştırmalar Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: .....

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

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygı değer hocam Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a,

Tez sonuçlarımın değerlendirilmesinde yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam Prof. Dr. Akif ÇÜRÜK'e, eğitimim sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve öğretim üyesi hocalarıma, çalışma arkadaşlarım Erkan ÖNER'e, Mehmet Emrah AKSAN'a ve diğer yüksek lisans arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren ve hayatımın her alanında maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen aileme, en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Bu araştırma, . . . . . kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

MART-2016

Perihan SÜMER

# KAHRAMANMARAŞ İLİNDE ALFA TALASEMİ GENOTİPLERİ

## Yüksek Lisans Tezi

Perihan SÜMER

### ÖZET

Alfa talasemi alfa globin zincirlerinin sentezindeki azalma veya hiç sentezlenememesinden kaynaklanan yaygın bir genetik hastalıktır. Alfa talasemi alfa globin gen zincirinde meydana gelen delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Alfa talasemiye belirleyici delesyonlar aynı kromozom üzerinde bir ( $\alpha$ -tal-2:  $-\alpha/\alpha$ ) veya iki ( $\alpha$ -tal-1:  $--/\alpha$ ) alfa globin genini kapsar. Non delesyonel alfa talasemi genel olarak alfa 2 ( $\alpha^T\alpha/\alpha$ ) geninde veya nadiren alfa 1 ( $\alpha\alpha^T/\alpha$ ) geninde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda oluşur.

Üç  $\alpha$ -gene ( $-\alpha/\alpha$ ) sahip bir kişi de anemi görülmezken iki fonksiyonel  $\alpha$ -gene ( $--/\alpha$ ) sahip heterozigot bir kişi de hafif hipokrom mikrositer anemi görülür.  $\alpha$ -tal-1 ve  $\alpha$ -tal-2 belirleyicilerinin kombinasyonlarına ( $--/-\alpha$ ) HbH'e neden olduğu gösterilmiştir. Tek bir alfa globin geni ( $--/-\alpha$ ) olan bir hasta da kronik hemolitik anemi ile HbH hastalığı görülmüştür. Türkiye'de alfa globin gen kümesinde beş farklı gen delesyonu [ $\alpha$ -tal-1 (-17.4kb, -26.5kb, -20.5kb) ve  $\alpha$ -tal-2 (-3.7kb, -4.2kb)] bildirilmiştir.

Bu çalışmada yüz kan örneği toplandı. Hematolojik veriler coulter cihazı ile ölçüldü. Hb varyantları HPLC ile belirlendi. İki bireyin beta talasemi taşıyıcısı olduğu belirlendi. Dokuz örnekte demir eksikliği anemisi veya alfa talasemi taşıyıcısı olabileceği görüldü. Genomik DNA izole edildi ve gap PCR ile yaygın gen delesyonları tarandı. Örneklerimiz de 20.5 kb'lık ( $\alpha$ -tal-1) ve 3.7 kb'lık ( $\alpha$ -tal-2) iki farklı gen delesyonu görüldü. Kahramanmaraş'ta alfa ve beta talasemi taşıyıcılığı ve gen delesyon dağılımı insidansı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Hemoglobinopati, Alfa talasemi, PCR

**Sayfa Adedi:** 82

**Danışman:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

# ALPHA THALASSEMIA GENOTYPES IN KAHRAMANMARAS

## Master Thesis

Perihan SÜMER

### ABSTRACT

Alpha thalassemia is a common genetic disorder that is characterized by deficient or absent synthesis of  $\alpha$ -globin chains. Alpha thalassemia usually result from deletions involving the  $\alpha$ -globin genes, less commonly they are due to point mutations. Most  $\alpha$ -thalassemia determinants are deletions involving one ( $\alpha$ -thal-2:  $-\alpha/\alpha\alpha$ ) or both ( $\alpha$ -thal-1:  $--/\alpha\alpha$ )  $\alpha$ -globin genes on the same chromosome. Nondeletional  $\alpha$ -thal results from point mutations involving the predominantly expressed  $\alpha_2$  gene ( $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ ) or rarely the  $\alpha_1$  gene ( $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ ).

A person with three  $\alpha$ -genes ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) is not anemic but a heterozygote who inherits two functional  $\alpha$ -genes ( $--/\alpha\alpha$ ) has mild hypochromic microcytic anemia. Combinations of  $\alpha$ -thal-1 and  $\alpha$ -thal-2 determinants ( $--/-\alpha$ ) cause HbH. A patient who inherited a single  $\alpha$ -globin gene ( $--/-\alpha$ ) has HbH disease with a chronic hemolytic anemia. Five different gene deletions [ $\alpha$ -thal-1 (-17.4kb, -26.5kb, -20.5kb) and  $\alpha$ -thal-2 (-3.7kb, -4.2kb)] on the alpha globin gene cluster were reported in Turkey.

In this study, one hundred blood samples were collected. Hematological parameters were obtained by cell counter. Hb variants were detected by HPLC. Two samples were detected as beta thalassemia trait and nine were alpha thalassemia trait or iron deficiency anemia. Genomic DNA was isolated and common gene deletions were screened by gap PCR. Two different gene deletion 20.5 kb ( $\alpha$ -thal-1) and 3.7 kb ( $\alpha$ -thal-2) were seen in our samples. Incidence of alpha and beta thalassemia trait and distribution of gene deletions were detected in Kahramanmaraş.

**Key Words:** Hemoglobinopathi, Alpha Thalassemia, PCR

**Page Number:** 82

**Supervisor:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	I
ÖZET .....	II
İNGİLİZCE ÖZET .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hemoglobin Molekülünün Tarihçesi.....	3
2.1.1. Hemoglobin molekülünün yapısı.....	3
2.1.1.1. Hem'in yapısı .....	5
2.1.1.2. Globin zincir gen yapısı.....	6
2.1.1.2.1. $\alpha$ -Benzer globin gen kümesi .....	7
2.1.1.2.2. $\beta$ -Benzer globin gen kümesi .....	8
2.2. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları .....	10
2.2.1. Anormal hemoglobinler .....	10
2.2.2. Talasemiler.....	12
2.2.2.1. $\beta$ – Talasemi .....	13
2.2.2.2. $\alpha$ –Talasemi .....	13
2.2.2.2.1. Delesyonel $\alpha$ –Talasemiler .....	14
2.2.2.2.1.1. $\alpha^0$ –Talasemiler.....	14
2.2.2.2.1.2. $\alpha^+$ - Talasemiler .....	15
2.2.2.2.2. Delesyonel olmayan (Nondelesyonel) $\alpha$ –Talasemiler .....	17
2.2.2.2.2.1. RNA “ Splicing”i etkileyen mutasyonlar.....	18
2.2.2.2.2.2. Poli A kuyruğu sinyalini etkileyen mutasyonlar.....	18
2.2.2.2.2.3.mRNA translasyonunun başlamasını etkileyen mutasyonlar.....	19
2.2.2.2.2.4. Frameshift delesyonları.....	20
2.2.2.2.2.5. Zincir sonlanma mutasyonları.....	21
2.2.2.2.3. $\alpha$ - Talasemilerin klinik tablosu .....	23
2.2.2.2.3.1. Sessiz taşıyıcı .....	24
2.2.2.2.3.2. Hemoglobin Trait.....	24
2.2.2.2.3.3. Hemoglobin H .....	25
2.2.2.2.3.4. Hemoglobin Bart's.....	26



2.2.2.2.4. $\alpha$ -Talasemilerin coğrafik dağılımı ve insidansı .....	28
2.2.2.2.4.1. Dünya’da $\alpha$ - talasemi insidansı .....	28
2.2.2.2.4.2. Türkiye’de $\alpha$ -talasemi insidansı .....	29
2.2.2.2.4.3. Kahramanmaraş’ta $\alpha$ -talasemi .....	29
2.3. Talasemi ve Transferrin Reseptörü .....	30
2.4. Talasemi ve Hemoglobinopatilerin Tanı ve İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler. ...	31
2.4.1. Klinik hematolojik özellikler .....	31
2.4.2. DNA analiz yöntemleri .....	33
2.4.3. RT-PCR ile mRNA analizi .....	34
2.5. Talasemide Tedavi Yöntemleri .....	35
2.5.1. Transfüzyon ve şelasyon tedavileri .....	35
2.5.2. Demir yükünün belirlenmesi ve izlem .....	36
2.5.3. Oral demir şelatörleri .....	36
2.5.4. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu .....	37
2.5.5. Gen tedavisi .....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	40
3.1. Kullanılan Malzemeler .....	40
3.2. Örnek Toplama .....	40
3.3. Analizler .....	41
3.3.1. Hematolojik İncelemeler .....	41
3.3.1.1. Coulter sayımı .....	41
3.3.1.2. HbA2 ölçümü .....	41
3.3.2. Moleküler Çalışmalar .....	41
3.3.2.1. Tam kandan DNA İzolasyonu .....	41
3.3.2.2. Hedef DNA’nın Çoğaltılması ve İşaretlenmesi .....	43
3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	44
4. BULGULAR .....	46
5. TARTIŞMA .....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	67
7. KAYNAKLAR .....	68
8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ .....	78
9. TABLOLAR DİZİNİ .....	80
10. EK-1 .....	81
11. ÖZGEÇMİŞ .....	82

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$	: Alfa
$\alpha^0$	: Alfa zinciri üretilmeyen
$\alpha^+$	: Bir alfa zinciri kısmen veya tamamen üretilen
$\beta$	: Beta
$\beta^0$	: Beta zinciri üretilmeyen
$\beta^+$	: Beta zinciri kısmen veya tamamen üretilen
$\delta$	: Delta
$\epsilon$	: Epsilon
$\gamma$	: Gama
$\Psi$	: Psi
$\sigma$	: Sigma
$\theta$	: Teta
$\zeta$	: Zeta
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
<b>A</b>	: Adenin
<b>C</b>	: Sitozin
<b>G</b>	: Guanin
<b>T</b>	: Timin
<b>bç</b>	: Baz Çifti
<b>cd</b>	: Kodon
<b>cP</b>	: Centi Poise
<b>Del</b>	: Delesyon
<b>dk</b>	: Dakika

<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dNTP</b>	: Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>Fe</b>	: Demir
<b>fl</b>	: Femtolitre
<b>Fsc</b>	: Frameshift
<b>g</b>	: Gram
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>Hb A<sub>2</sub></b>	: Hemoglobin A <sub>2</sub>
<b>Hb C</b>	: Hemoglobin C
<b>Hb D</b>	: Hemoglobin D
<b>Hb E</b>	: Hemoglobin E
<b>Hb F</b>	: Fetal Hemoglobin
<b>Hb S</b>	: Orak Hücre
<b>Hct</b>	: Hematokrit
<b>HKHN</b>	: Hematopoetik kök hücre nakli
<b>HS</b>	: Hipersensitif
<b>IVS</b>	: Intron dizileri
<b>Kb</b>	: Kilo baz
<b>kDa</b>	: Kilo dalton
<b>M</b>	: Molar
<b>MCH</b>	: Hücre içindeki ortalama hemoglobin miktarı
<b>MCHC</b>	: Ortalama hemoglobin konsantrasyonu
<b>MCV</b>	: Ortalama eritrosit hacmi
<b>Nk</b>	: Doğal katil hücreler

<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pg</b>	: Pikogram
<b>RBC</b>	: Kırmızı kan hücresi (Eritrosit)
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>URE</b>	: Upstream Region Elements
<b>UTR</b>	: Untranslation Region
<b>UV</b>	: Ultra Viole
<b>WBC</b>	: Beyaz kan hücresi (Lökosit)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik olarak hemoglobin sentezindeki bir bozukluk nedeni ile ortaya çıkan anormal hemoglobinler ve talasemiler dünyada en yaygın görülen otozomal resesif geçiş gösteren kan hastalıklarıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlarına göre, dünyada talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı %5'dir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır. Her yıl yaklaşık 365.000 hasta çocuk dünyaya gelmektedir (1,2,4).

Talasemi sendromları oldukça geniş bir genetik bozukluk nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Sentezi bozulan globin zincirine göre  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta\beta$ ,  $\epsilon\gamma\delta\beta$  talasemiler olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri  $\alpha$  ve  $\beta$  talasemilerdir.  $\alpha$  talasemi daha çok Uzak Doğu'da görülürken,  $\beta$  talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de yaygındır. Günümüzde  $\beta$  talasemiye neden olan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Moleküler çalışmalar ile 200'den fazla  $\beta$  talasemiye neden olan mutasyon belirlenmiştir. Bunların çoğunu nokta mutasyonları daha az bir kısmını delesyonel mutasyonlar oluşturmaktadır. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlenmesini ve stabilitesini önleyerek normal globin sentezini önler. Buna karşın çerçeve kayması ve zincir mutasyonları translasyonu bloke ederler (3,4).

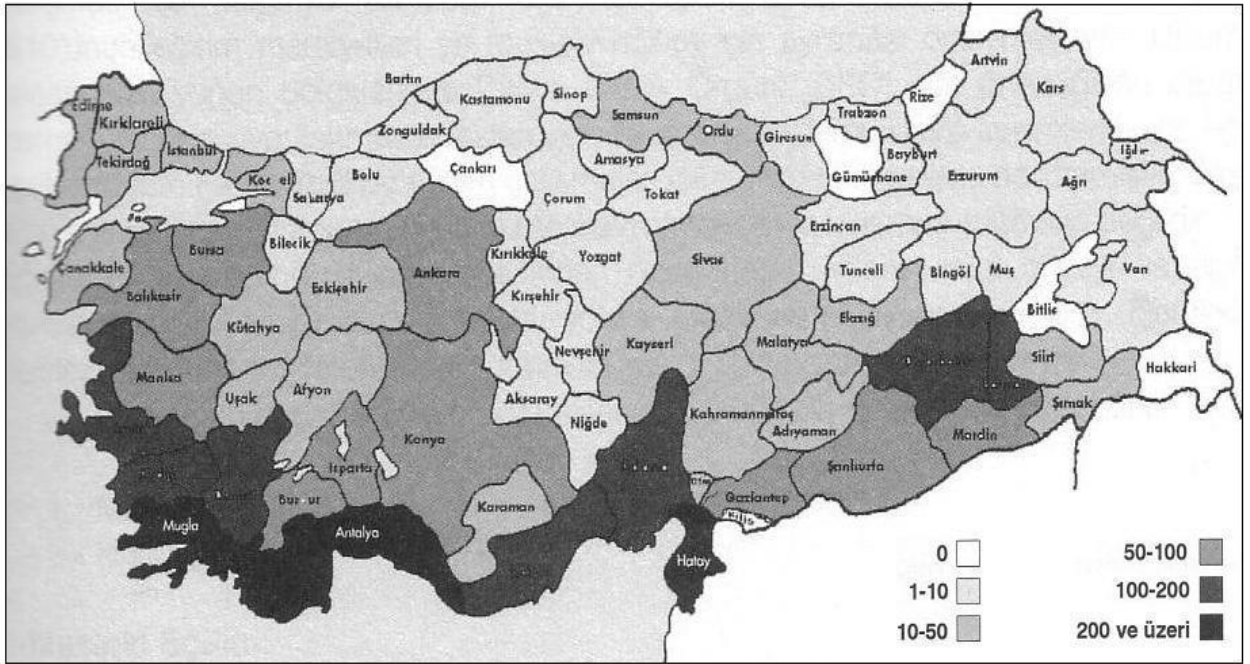
Ülkemizde ilk tarama çalışması Çavdar ve Arcasoy tarafından yapılmış olup Türkiye insidansının % 2,1 olduğu bildirilmiştir. Ancak bu oran bölgelere göre değişmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı'nın kayıtlarına göre Türkiye'de yaklaşık 4000 talasemi hastası bulunmaktadır (2,4).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda 30'dan fazla talasemi mutasyon tipi bulunmuştur. En yaygın beş  $\beta$  talasemi mutasyonu sırasıyla IVSI-110 (%40), IVSI-6 (%10), IVSII-1 (%8), IVSII-745 (%6) ve IVSI-1 (%5)'dir. Bu mutasyonların görülme sıklıkları bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin; Türkiye'de en sıklıkla rastlanan  $\beta$  talasemi mutasyonu IVS I-110'un %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da % 50'yi aşmakta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir. Bu yüzden farklı bölgelerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak Türkiye'nin talasemi mutasyonları açısından tam bir haritasının çıkarılması gerekmektedir. Şekil 1.1'de Türkiye'deki vaka sayısına göre talaseminin illere göre dağılımı

görülmektedir. Ayrıca doğum öncesi tanı çalışmalarına da yardımcı olmak amacıyla mutasyon tiplendirmesi yapılmalıdır (2,4).

Türkiye’de yapılan tarama çalışmaları ve buna ek olarak kayıtlı hasta sayısı dikkate alındığında talasemi ve anormal hemoglobinlerin ulusal bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, Kahramanmaraş ilinde anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tipleri moleküler düzeyde araştırılarak ülkemizin talasemi haritasının oluşturulmasına veri sağlanacaktır.



Şekil 1. Türkiye'nin talasemi haritası

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemoglobin Molekülünün Tarihçesi

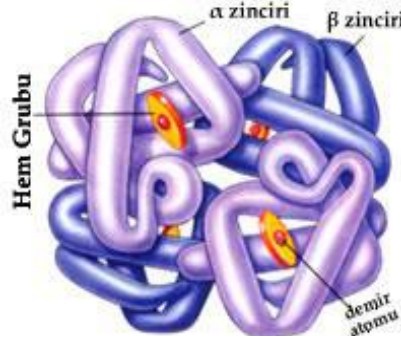
William Harvey'in kan dolaşımı üzerine yaptığı çalışmaları takiben Robert Boyle ve Richard Lower venöz kanın pulmoner dolaşımında oksijenlendiğini ileri sürmüşlerdir. 1862 yılında Hoppe ve Seyler ilk kez 'Hemoglobin' ifadesini kullanarak yapının oksijen taşıyan pigment olduğunu tanımlamışlardır. 1912 yılında Kuster tarafından hemoglobinin yapısında yer alan hem halkası çalışılmış ancak 1950'li yıllara gelene kadar tam olarak hemoglobinin yapısı anlaşılamamıştır. Bu yıllarda Sanger'in proteinler üzerine yaptığı çalışmalar sonucu hemoglobin molekülünün yapısı anlaşılmaya başlanmıştır. Pauling, Schroeder, Rhinesmith ve Ingram tarafından yapılan araştırmalar sonucunda hemoglobin molekülünün iki  $\alpha$  ve iki  $\beta$  globin zincirinden oluşan tetramer yapıda bir protein olduğu öne sürülmüştür. Bu dönemde Perutz ve çalışma arkadaşları tarafından X-ray analizi sonucunda hemoglobinin üç boyutlu yapısı çözümlenmiştir. 1960'li yılların başlarında ise hemoglobin molekülünün işlevi Bohr ve Krogh tarafından açıklanmıştır (5).

#### 2.1.1. Hemoglobin molekülünün yapısı

Eritrositlerde bulunan hemoglobin (Hb) molekülü, 64.5 kDa ağırlığında, maksimum çapı 6.4 nm olan tetramerik proteindir (6,7). Hemoglobin molekülünün %96'sı 4 adet globin zincirinden, geri kalanı bu globin zincirlerine bağlı hem'lerden oluştuğu Şekil 2'de gösterilmiştir (8).

Hemoglobin yapısında bulunan globin zincirlerinin amino asitlerinin cins, sayı ve sırası değişken iken; hem grubu aynıdır. Sağlıklı yetişkin bireyde hemoglobin A (Hb A) %95-97, hemoglobin A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) %2-3 ve hemoglobin F (Hb F) ise % 1'in altındadır (9). Hb A, iki  $\alpha$ -globin zinciri ve iki  $\beta$ -globin zincirinden meydana gelmiştir.  $\alpha$ -globin zinciri, 141 amino asit;  $\beta$ -globin zinciri de 146 amino asit içerir. Hb A<sub>2</sub>, iki  $\alpha$ -globin zinciri ve iki  $\delta$ -globin zincirinden oluşmaktadır,  $\delta$ -globin zinciri 146 amino asit içerir. Hb F ise iki  $\alpha$ -globin zinciri

ve iki  $\gamma$ -globin zincirinden meydana gelir,  $\gamma$ -globin zinciri 146 amino asit içermektedir (5,10,11).



**Şekil 2.** Hemoglobin molekülünün yapısı

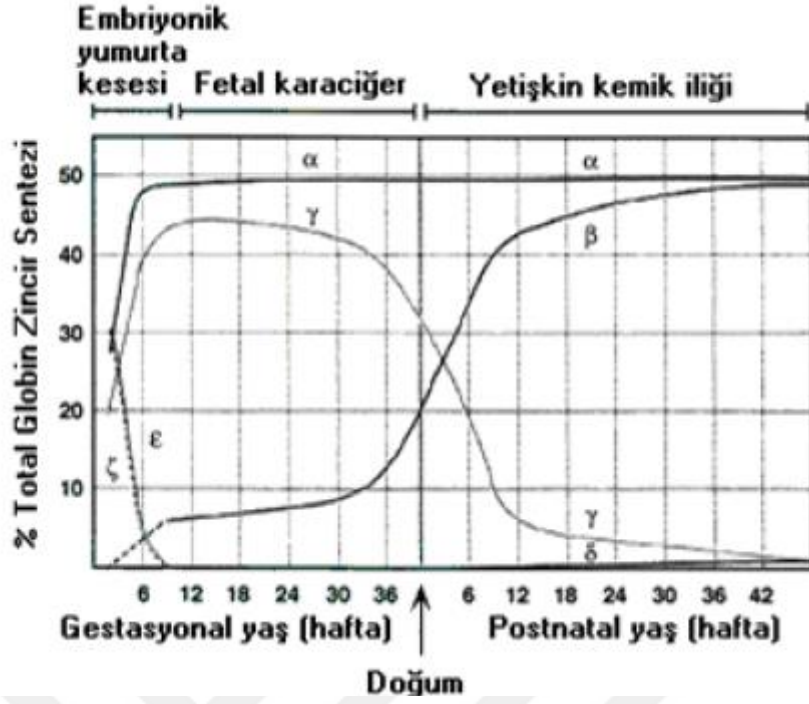
Embriyonik hayatın erken evresinde, yolk kesesinde Hb Gower 1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Hb Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) ile Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) üretilir. Gebeliğin yaklaşık 8. haftasında fetal karaciğerde, predominant olarak HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) ve az miktarda (<%10) Hb A sentezi yapılmaktadır. Gebeliğin 18. haftasından doğuma kadar geçen sürede kırmızı hücre üretimi yavaş yavaş fetal karaciğerden kemik iliğine geçmektedir (8,12) (Tablo 1).

**Tablo 1.** Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri

<i>Hb ADI</i>	<i>FORMÜLÜ</i>	<i>SENTEZLENDİĞİ DÖNEM</i>
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embriyo
Hb Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	
Hb Portland I	$\zeta_2\gamma_2$	
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Fetüs
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Yetişkin
Hb A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	

Doğumdan sonra Hb F miktarı azalırken Hb A üretiminin artışı Şekil 3'de gösterilmiştir.





Şekil 3. İnsan globin zincirlerinin sentez zamanı

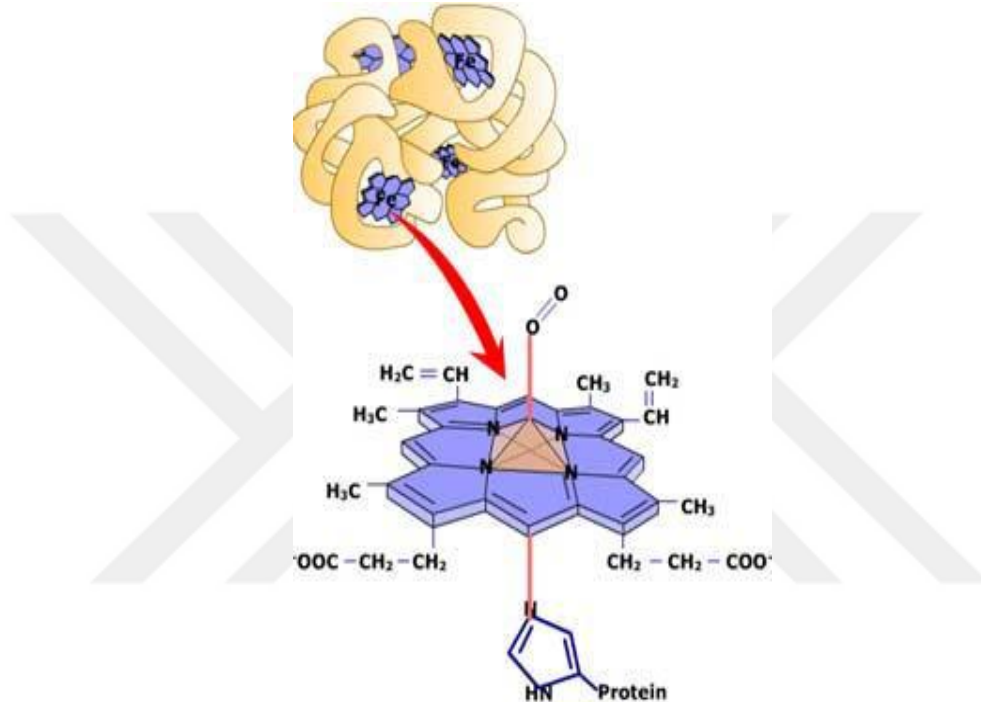
#### 2.1.1.1. Hem'in yapısı

Hemoglobin molekülü 4 hem halkası ve 4 globin zinciri içerir. Hem grubu, 4 pirok halkasından meydana gelen protoporfirin IX halkası ve bir demir atomundan oluştuğu Şekil 4'de görülmektedir.



Şekil 4. Hem'in yapısı

Hem yapısındaki +2 değerlikli demir atomları ( $Fe^{+2}$ ) oksijenin ( $O_2$ ) dokulara taşınmasını sağlar. Demir, hem molekülünün merkezindeki 4 adet azot atomuna (N); diğer iki bağı ise porfirin halkasının globin zinciri ile yapar. Hemoglobinde bu pozisyonlardan biri globin molekülündeki histidine diğeri oksijene bağlanır. Tüm hemoglobinlerde hem halkasının yapısı Şekil 5’de belirtilmiştir (8,10).



**Şekil 5.** Hem halkasının oksijene ve histidine bağlanması

Hem’in konjuge çift bağlardan oluşan yoğun ağ yapısı, görünür spektrumun alt ucundaki ışınları yutarak moleküle koyu kırmızı renk verir. Tetrapiroller düzlemsel halka içinde 4 metenil köprüleri ile birbirine bağlanır. Hem halkasının yan zincirleri M (Metil), V (Vinil), M, V, M, Pr (Propiyonat), Pr, M şeklinde sıralanır (10).

#### 2.1.1.2. Globin zincir gen yapısı

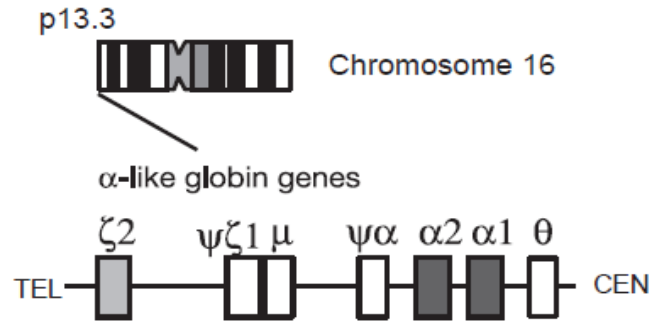
1950’li yılların sonunda yapılan araştırmalar  $\alpha$  ve  $\beta$  globin zincirlerinin farklı kromozomlardan sentezlendiğini ortaya koymuştur (13). Normal insan hemoglobinleri; gelişim süresince birbirinden farklı  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  globin zincirlerinden oluşur (5,14). Bu

globin zincirleri ise;  $\alpha$ -globin gen kümesi ve  $\beta$ -globin gen kümeleri tarafından sentez edilirler (7,14).

#### 2.1.1.2.1. $\alpha$ -Benzer globin gen kümesi

İnsan  $\alpha$ -benzer globin gen kümesi, 16. kromozomun kısa kolunun 13.3 lokusunda yaklaşık 80 kb'lık yer işgal eder (15,16). Üç ekzon ve iki intron bölgesinden oluşan  $\alpha$ - globin geni 141 amino asiti kodlamaktadır (7,14,17,18).  $\alpha$ - geninin ekzon 1'inde ilk 31 aminoasit, ekzon 2'de (32–99) 68 aminoasit ve ekzon 3'de (100–141) 42 aminoasit kodlanmaktadır.  $\alpha$ -globin gen kümesi ve bu bölgeleri sentezleyen DNA parçası; 5 Alu tekrar ailesi, CpG bölgeleri ve G-C'den zengin bölgeler içermektedir (13,17).

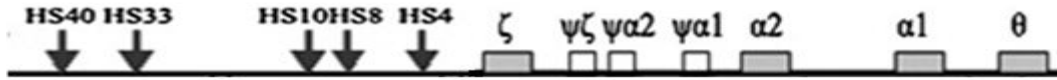
$\alpha$ -globin gen kümesi, iki alfa genini ( $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$ ), bir embriyonik alfa benzeri genini ( $\zeta_2$ ), üç pseudo genini  $\psi\zeta_1, \psi\alpha_2(\mu), \psi\alpha_1$  ve bir de teta genini ( $\theta$ ) içerir (13). 5' uçtan başlayarak 3' ucuna doğru bu genler  $\zeta_2, \psi\zeta_1, \psi\zeta_2(\mu), \psi\alpha_1, \alpha_2, \alpha_1$  ve  $\theta$  şeklinde sıralandığı Şekil 6'da gösterilmiştir (5).



Şekil 6. Alfa benzer globin gen kümesi

$\alpha$ - lokusunda bulunan  $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$  genleri yapısal olarak benzer protein ürünü vermekte olup sadece kodlanmayan (UTR) 5' ve 3' bölgelerinde dizi farkı bulunmaktadır. Alfa benzeri gen grubunda yer alan pseudo genlerin ( $\Psi\zeta, \Psi\alpha_2, \Psi\alpha_1$ ) işlevleri tam olarak bilinmediğinden evrimsel kalıntılar olduğu düşünülmektedir. Teta ( $\theta_1$ ) geninin korunmuş yapısı ve inaktive edici hiçbir mutasyonu taşıması işlevsel olabileceğini düşündürmekte ancak bugüne kadar genin protein ürünü bulunamamıştır (12).

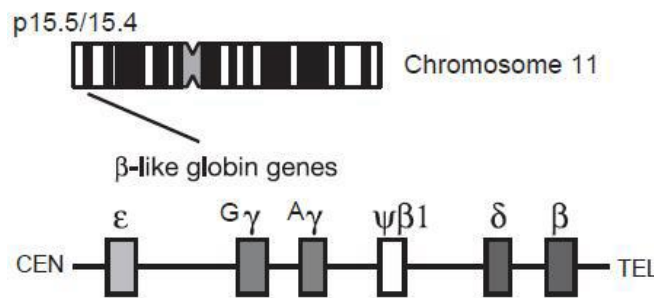
$\alpha$ - globin gen kümesinin sentezi upstream düzenleyici elementler ( $\alpha$ -URE) ile düzenlenir.  $\alpha$ - benzer globin gen kümesinin ekspresyonu 5 farklı DNAaz I HS (hipersensitif) dizileri tarafından kontrol edilmektedir. Bu diziler HS4, HS8, HS10, HS33 ve HS40 olup; Şekil 7’de gösterilen  $\alpha$ - globin gen kümesinin upstream bölgesinde lokalize olmuşlardır.  $\alpha$ - benzer globin gen kümesinin aşırı ekspresyonu durumunda DNAaz I hipersensitif bölgeler, sentezi kontrol altına almaktadırlar (15,16).



**Şekil 7.** Alfa benzer globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler

#### 2.1.1.2.1. $\beta$ -Benzer globin gen kümesi

İnsanlarda  $\beta$ -benzer globin gen kümesi 11. kromozomun kısa kolunda 70 kb’den daha büyük alanda yerleşiktir (15,19). Üç ekzon ve iki intron içeren  $\beta$ -geni 146 amino asit kodlamaktadır (7,14,17,18).  $\beta$ -geninin ekson 1’inde ilk 30 aminoasit, ekson 2’de ise 74 (31–104) amino asiti ve ekson 3’de 42 aminoasit (105–146) kodlanmaktadır.  $\beta$ -globin gen kümesi 8 Alu tekrar ailesi içermektedir. Ancak CpG bölgeleri içermemektedir (14).  $\beta$ -benzer globin genler; 5' -  $\epsilon$  -  $G\gamma$ - $A\gamma$  -  $\Psi\beta 1$  -  $\delta$  -  $\beta$  -3' ucuna doğru sıralanması Şekil 8’de gösterilmiştir.



**Şekil 8.** Beta benzer globin gen kümesi

$\beta$ -lokusu üzerinde bulunan  $A\gamma$  ile  $G\gamma$  genleri yapısal olarak benzer protein ürünü vermektedir.  $G\gamma$  -globin zincirinde 136. amino asit Glisin,  $A\gamma$  globin zincirinde ise aynı

pozisyonda Alanin amino asiti bulunmaktadır. Beta gen grubunda yer alan  $\Psi\beta$ 'nın bilinen işlevi bulunmamaktadır (12).

$\beta$ -benzer globin gen kümesinin transkripsiyonel düzenleme bölgesi olan LCR (Locus Control Region) yaklaşık 20 kb uzunluğunda,  $\epsilon$  geninin 6-18 kb önünde yer alır. LCR'de transkripsiyonel düzenlemeyi yapan 5 farklı HS dizisi bulunmaktadır. Bu diziler HS1, HS2, HS3, HS4 ve HS5'ten oluştuğu Şekil 9'da gösterilmekte ve bu dizilerden her biri, transkripsiyonu aktifleştirmede ya da baskılamada görev almaktadırlar (19).



**Şekil 9.** Beta benzer globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler

## 2.2. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları

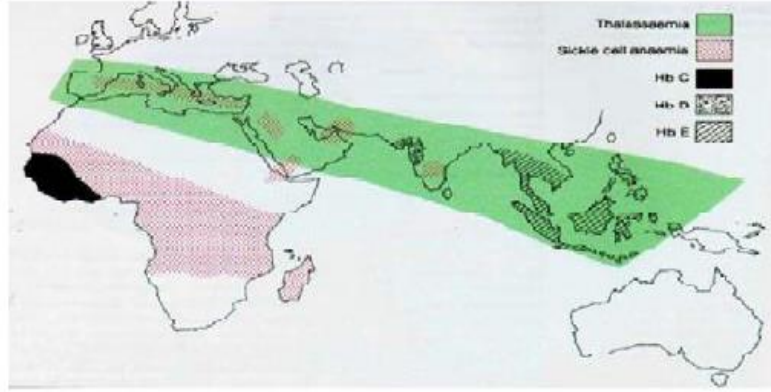
Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerindeki değişikliklerin tümü hemoglobinopatileri meydana getirmektedir (20). Hemoglobin molekülünün yapısında meydana gelen anomali üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; globin zincirlerinin yapısal değişimleri sonucu oluşan anormal hemoglobinler, yapısal olarak normal globinlerin yetersiz sentezi, ya da hiç sentezlenememesi sonucu oluşan talasemiler ve fetal hemoglobin sentezinin erişkin dönemde devam etmesi sonucunda oluşan “Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH)” olarak sınıflandırılmış ve Tablo 2 'de gösterilmiştir (5,21,22).

**Tablo 2.** Hemoglobin molekülünün kalıtsal bozukluklarının sınıflandırılması

Anormal Hemoglobinler	Talasemiler	HPFH
$\alpha$ - Zinciri	$\alpha$ - Talasemi	Delesyonel
$\beta$ - Zinciri	$\beta$ - Talasemi	Nondelesyonel
$\gamma$ - Zinciri	$\delta\beta$ - Talasemi	$\beta$ - gen kümesine bağlı
$\delta$ - Zinciri	$\gamma\delta\beta$ -Talasemi	$\beta$ - gen kümesine bağlı
Füzyon Zincirleri ( $\delta\beta$ , $\beta\delta$ , $\gamma\beta$ )	$\gamma$ - Talasemi $\delta$ - Talasemi	olmayan

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) araştırmalarına göre dünyada hemoglobinopati taşıyıcı sıklığı %5.1'dir (23). Her yıl yaklaşık 365.000 hasta çocuğun dünyaya geldiği bilinmektedir

(4). Günümüze kadar toplam hemoglobin varyantlarının ve talasemilerin sayısı 1382'dir. Bu kalıtsal bozukluklar sıklıkla Akdeniz, Afrika ve Asya kıtalarında görülmekte, ancak göçlerle Amerika, Avrupa ve Avustralya kıtalarına da yayıldığı Şekil 10'da gösterilmiştir (23-26). Türkiye'de ilk hemoglobinopati çalışmaları Muzaffer Aksoy tarafından yapılmaya başlanmıştır (2).



Şekil 10. Hemoglobin varyantlarının ve talasemilerin dünya üzerindeki yayılımı

### 2.2.1. Anormal hemoglobinler

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerini kodlayan genlerin ekzon bölgelerindeki veya bunun dışındaki bölgelerde meydana gelen nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli hemoglobin varyantlarının oluşumuna yol açmaktadır (4,6,23).

Anormal hemoglobinlerin çoğu nokta mutasyonu sonucunda oluşmaktadır. Bu mutasyonlar polipeptid zincirinde bir veya daha fazla aminoasit değişimine neden olmaktadır. Delesyonlar polipeptid zincirinin kısalmasına, insersiyonlar ise uzamasına yol açmaktadır. Homolog olmayan crossing-over sonucu oluşan bazı varyantlar ise normal uzunlukta hibrit polipeptid zincirleri içermektedirler (23,25,27-29).

Dünyada bilinen anormal hemoglobin sayısı 1037'dir. Türkiye'de ve dünyada en yaygın olarak gözlemlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C'dir. Bugüne

kadar Türkiye genelinde belirlenen  $\alpha$  globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler Tablo 3'te verilmiştir (30,31).

**Tablo 3.** Türkiye'de belirlenen alfa globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler

Mutasyonun Adı	Mutasyon Tipi
Hb - O - Padova <sup>33,33</sup>	$\alpha$ -30 (B11) Glu→Lys (GAG→AAG)
Hb - Hasharon <sup>33,34,36</sup>	$\alpha$ -47 (CE5) Asp→His (GAC→CAC)
Hb - Montgomery <sup>33,36</sup>	$\alpha$ - 48 (CE6) Leu→Arg (CTG→CGG)
Hb - Adana <sup>33,37,38,39</sup>	$\alpha$ - 59 (E8) Gly→Asp (GGC→GAC)
Hb - J - Anatolia <sup>33,40</sup>	$\alpha$ - 61 (E10) Lys→Thr (AAG→ACG)
Hb - Ube -2 <sup>33,38</sup>	$\alpha$ - 68 (E17) Asn→Asp (AAC→GAC)
Hb - Q - İran <sup>33,34,41</sup>	$\alpha$ - 75 (EF4) Asp→His (GAC→CAC)
Hb - Moabit <sup>33,42</sup>	$\alpha$ - 86 (F7) Leu→Arg (CTG→CGG)
Hb- M-Iwate <sup>33,43</sup>	$\alpha$ - 87 (F8) His→Tyr (CAC→TAC)
Hb - Çapa <sup>33,39,44</sup>	$\alpha$ - 94 (G1) Asp→Gly (GAC→GGC)
Hb - Georgia <sup>33,43</sup>	$\alpha$ - 95 (G2) Pro→Leu (CCG→CTG)
Hb - Strumica <sup>33,46</sup>	$\alpha$ - 112 (G19) His→Arg (CAC→CGC)
Hb - J - Meerut <sup>33,47</sup>	$\alpha$ - 120 (H3) Ala→Glu (GCG→GAG)
Hb Setif <sup>34,48</sup>	$\alpha$ - 94 (G1) Asp→Tyr (GAC→TAC)
Hb Bronova <sup>34,49</sup>	$\alpha$ - 103 His →Leu (CAC→TAC)
Hb - J- Paris I' <sup>34,50</sup>	$\alpha$ 2(A10) Ala→Asp $\beta$ 2 (C→A)
Hb Constant Spring <sup>33,36</sup>	$\alpha$ - 142 (H19)( +31 uzamış zincir)

Hb Çapa ve Hb Adana ilk kez Türk toplumunda saptanan anormal hemoglobinlerdir (4,6,12,32). Alfa globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinlerden Hb Adana, Hb Hasharon, Hb Moabit, Hb Çapa ve Hb Constant Spring unstabil hemoglobinlerdir (12).

Hb Adana varyantı [ $\alpha$ - 59 (E8) Gly→Asp (GGC→GAC)]  $\alpha^0$ -talasemi ile birlikte tespit edilmiştir ve bu hastada Hb Barts, HbA'dan sonra ikinci majör hemoglobin olarak bulunmuştur (6,12,33).

Hb Ube-2  $\alpha$ -68 (E17) Asn→Asp (AAC→GAC) hızlı hareket eden hemoglobin varyantı olup ilk kez Japon ırkında gösterilmiştir. Bilginer ve arkadaşları tarafından 1984 yılında bir Türk ailesinde belirlenmiştir (34). Bu mutasyonun sadece Japon ve Türk ırklarında görülmesi popülasyon genetiği açısından önemlidir (2).



Dinçol ve arkadaşları bir Türk olguda Hb J-Meerut [ $\alpha$ -120(H3) Ala $\rightarrow$ Glu (GCG $\rightarrow$ GAG)] mutasyonu olduğunu göstermişlerdir. Hb J-Meerut'de, oksijen afinitesinde hafif artış, arteriyel kanda düşük P50 değerleri ve kırmızı kan hücre sayısında hafif bir artış olduğu bildirilmiştir (32,35).

Hb Q- İran [ $\alpha$ - 75 (EF4) Asp $\rightarrow$ His (GAC $\rightarrow$ CAC)] ilk kez İran'da bulunduktan sonra Aksoy tarafından Türkiye'de de bu varyantın olduğu gösterilmiştir. Özdağ ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ilk kez homozigot Hb Q- İran [ $\alpha$ -75 (EF4) Asp $\rightarrow$ His] gösterilmiştir (36,37).

### **2.2.2. Talasemiler**

Talasemi; hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerinden birisinin veya birden fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğu ile karakterize olan genetik kan hastalığıdır (6,21,38,39).

Talasemi ilk defa 1925'de Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra bu herediter hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, eritroblastozis ve Akdeniz anemisi gibi adlar verilmiştir. George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri olguların Akdeniz civarı ülkelerden gelmesinden dolayı bu hastalığa Yunanca deniz anlamına gelen "Thalassemia" adını vermişlerdir. Daha sonra bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkeleri toplumlarında olmadığı diğer toplumlarda da bulunduğu saptanmıştır (2).

Talasemiler, otozomal mutant genler sonucu oluşur. Dünyada en sık görülen genetik hastalıktır. Özellikle Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölümleri Hindistan ve Asya'ya içine alan kuşakta yüksek sıklıkla gözlenmektedir. Azalmış veya sentezlenemeyen globin zincirine göre sınıflandırılır (21,38,39). En iyi tanımlanan tipleri  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta\beta$  ve  $\epsilon\gamma\delta\beta$  talasemilerdir (40). Türk toplumunda talasemiye ait ilk moleküler çalışmalar 1987 yılında Akar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (41).

#### **2.2.2.1. $\beta$ -Talasemi**

$\beta$ -talasemi; hemoglobin molekülünde yer alan  $\beta$  – globin zincirinin sentezinin azalması ve buna bağlı olarak da  $\alpha$  – globin zincirinin sentezinin artması sonucu karakterize edilen bir



hastalıktır.  $\beta$  zincir eksikliği sonucu artan  $\alpha$  zinciri hemoglobin molekülünün tetramer yapısını oluşturamaz ve kemik iliğindeki gelişen kırmızı kan hücre öncülleri içinde çökerler.  $\beta$  talaseminin klinik şiddeti zincir dengesizliğinin derecesi ile orantılıdır.  $\beta$  geni üzerinde meydana gelen mutasyonlardan dolayı  $\beta$  globin zinciri hiç sentezlenemiyorsa  $\beta^0$ , az sentezleniyorsa  $\beta^+$  talasemi olarak ifadelendirilir (42).  $\alpha$  talasemilerin aksine  $\beta$  talasemiler daha çok nokta mutasyonları sonucu oluşurlar (43).

$\beta$ -talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye’de sıklıkla gözlenmektedir (40). Türkiye’de talasemi ile ilgili ilk çalışmalar Aksoy tarafından yapılmıştır. Talasemi sıklığını göstermeye yönelik ilk çalışma ise Çavdar ve Arcasoy tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda  $\beta$  talasemi sıklığına yönelik çalışmalar Türkiye’nin birçok bölgesinde yapılmış olup yoğunluğun güney illerinde daha yüksek olmak üzere değişik bölgelerde % 0,6-12 arasında değiştiği saptanmıştır.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2,1 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye’nin bazı yörelerinde %10’a kadar çıkmaktadır (44,45). Bu oran Çukurova bölgesinde ise %3,7 olup 20’nin üzerinde beta talasemi mutasyonu saptanmıştır (46-48).  $\beta$  – talasemiye moleküler düzeyde araştıran çalışmalarda; Türkiye’de 43’ün üzerinde farklı mutasyon bulunduğu ve  $\beta$  – talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen bir yapı gösterdiği saptanmıştır (41,49,50).

Türkiye’de en sıklıkla rastlanan  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS-I-110’dur. Bunu IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1, Cd39, -30 ve FSC-5 mutasyonları takip etmektedir (40,46).

#### 2.2.2.2. $\alpha$ – Talasemi

$\alpha$ -talasemiler; hemoglobin molekülünün yapısında yer alan  $\alpha$  globin zincirindeki azalma veya tamamen engellenmesi ile karakterize edilen yaygın bir kalıtsal hastalıktır. Normal bireylerde her kromozomda iki tane  $\alpha$  globin geni ( $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$ ) olmak üzere toplam dört gen ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) bulunmaktadır (51). Normal alfa genleri ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), bir genin eksikliği ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), iki alfa geni eksikliği ( $-\alpha/-\alpha$ ), ( $--/\alpha\alpha$ ), üç alfa geninin eksikliği (Hb H hastalığı) ( $-\alpha/--$ ) ve dört alfa geninin eksikliği (Hidrops fetalis) ( $--/--$ ) olarak ifadelendirilmektedir (52). Alfa talasemiye sıklıkla delesyonel mutasyonlar neden olurken bunun yanı sıra nondelesyonel mutasyon tipleri de bulunmaktadır (51,53).

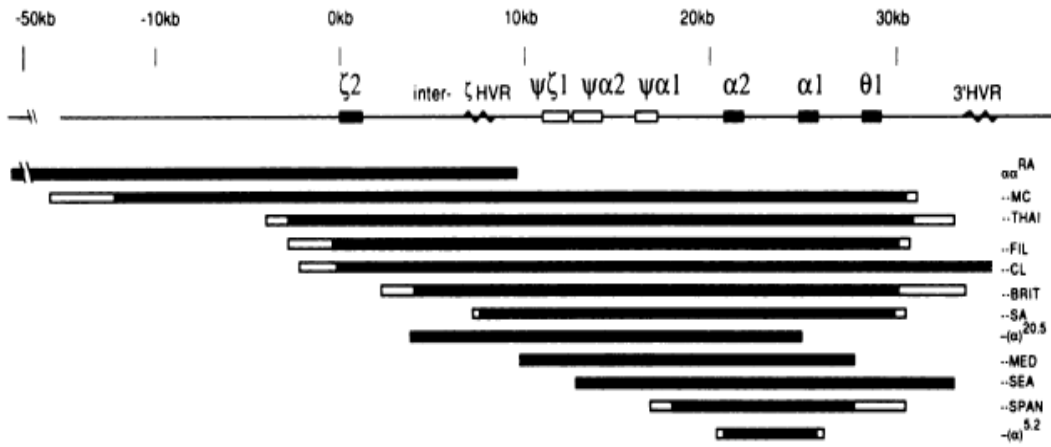
$\alpha$  talaseminin iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan  $\alpha$ -globin zincirinin yokluğu ile karakterize edilen  $\alpha^0$ -talasemidir. Diğeri ise hematolojik bulguları tam belirgin olmayan  $\alpha^+$ -talasemi'dir (11,53).  $\alpha^0$ -Talasemi her iki globin zincirini içeren büyük delesyonlar sonucu oluşurken,  $\alpha^+$ -talasemi iki globin geninin birinin delesyonu ya da nondelesyonu sonucu oluşur (11).

$\alpha$ - Globin genlerindeki delesyonla birlikte  $\zeta$ -globin mRNA ekspresyonunda da bir artış vardır. Normal bireylerde düşük  $\zeta$ -globin mRNA düzeyleri görülürken,  $\alpha^0$  – talasemi,  $\alpha^+$  – talasemi ve Hb H hastalığında  $\zeta/\alpha$ -mRNA oranı yükselmektedir.  $\alpha^0$ -Talasemi ve Hb H hastalığındaki  $\zeta/\alpha$  mRNA oran artışı ise daha belirgindir (11,53,54).

#### 2.2.2.2.1. Delesyonel $\alpha$ –Talasemiler

##### 2.2.2.2.1.1. $\alpha^0$ –Talasemiler

$\alpha^0$ - talasemilerde farklı uzunluklarda delesyonlar saptanmıştır.  $\alpha^0$ -talasemilerde gözlenen küçük ve büyük ( $-\alpha^{5.2}$  ve  $-\alpha^{20.5}$ ) delesyonlar her iki  $\alpha$ -globin genini etkilemektedir (22). Bu tip talasemi de,  $(\alpha\alpha)^{RA}$  delesyonu hariç,  $\alpha$ - globin genlerinin her ikisindeki tam ya da kısmi delesyonlar meydana gelmektedir ve delesyonlar Şekil 11'de gösterilmiştir (11).



**Şekil 11.**  $\alpha^0$  Talasemilere neden olan delesyonel mutasyonların büyüklükleri

Delesyonlardan birkaçı  $\alpha$ -globin genleri ile birlikte  $\zeta$  genini de içermektedir. Bu delesyonlarda heterozigotlar normal gelişip yaşamlarını sürdürebilmekte iken homozigotlar, embriyonik ( $\zeta_2\gamma_2$ ,  $\zeta_2\varepsilon_2$ ,  $\alpha_2\varepsilon_2$ ) ve fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) hemoglobinerine sahip olmadıklarından gebeliğin erken dönemlerinde kaybedilir (22,53).

Önceleri  $\alpha$ -talasemiler de delesyonların genin sadece ifade edilen bölgelerinde olduğu kabul edilmiştir. Ancak delesyonların bu bölgenin her iki (5',3') uzak ucunda da olabileceği gösterilmiştir.  $\alpha$  globin genlerinin ifadesi  $\zeta_2$  geninin 5' ucundan 40 kb uzaklığında bulunan DNA parçasına önemli derecede bağımlı olduğu gösterilmiştir (22,55,56). Bu bilgi, eritroide özgün "DNAaz I-hipersensitif" bölgesiyle ilişkilidir ve hipersensitif ailesinden HS-40'in etkisi Hatton ve arkadaşları tarafından alfa talasemili bir hastada gösterilmiştir. Bu hastada  $(\alpha\alpha)^{RA}$  mutasyonu ile  $\alpha$ - gen kümesinin HS-40'ı da içine alan 5' tarafında 62 kb'lık bir delesyon bulunmuştur. Bu olguda her iki  $\alpha$  geni tamamen normal olduğu halde işlev göstermediği anlaşılmıştır. Bu bulgulardan sonra aynı bölgede HS-40'ı içine alan farklı delesyon büyüklüklerini içeren olgular saptanmıştır (22,57).

Bernet ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmada bu delesyonları içeren kromozomların normal kromozomlara göre %1'den az mRNA ürettiğini ve bu nedenle de  $\alpha$ -globin gen ifadelerinin ciddi derecede azaldığını belirtmişlerdir (22,58).

$\alpha^0$ -talasemiler de gözlenen delesyon tiplerinden bazıları sadece bir iki bireyde gözlemlenirken bazıları da Akdeniz ve Güney Batı Asya bölgelerinde yaygın olarak gözlenmektedir (22). Bu alfa talasemi tipleri ( $--^{MEDI}$ ), ( $--^{MEDII}$ ), ( $-(\alpha)^{20.5}$ ), ( $--^{SPAN}$ ), ( $--^{CANT}$ ) ve ( $-(\alpha)^{5.2}$ ) Akdeniz toplumlarında oldukça yaygındır (11, 53).

#### 2.2.2.2.1.2. $\alpha^+$ -Talasemiler

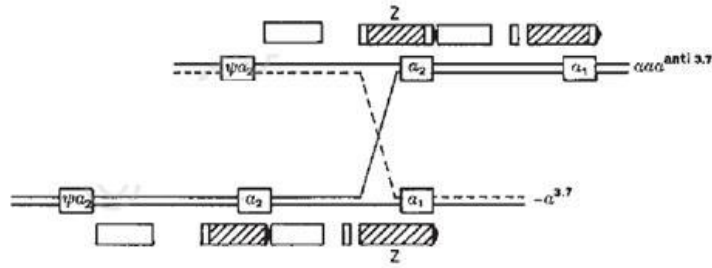
Küçük delesyonlar sonucu meydana gelen  $\alpha^+$  talasemiler dünyada sıkça görülmektedir. En yaygın olarak 3.7 kb'lık DNA ( $-\alpha^{3.7}$ ) kaybı gözlenmekte ve bunu takiben 4.2 kb'lık DNA ( $-\alpha^{4.2}$ ) kaybı gözlenmektedir (11,53,59,60).

$\alpha$  – globin genleri 4 kb büyüklüğünde yüksek homoloji gösteren iki eşleşme birimleri arasında yer alırlar. Evrim sürecinde eşit olmayan çaprazlanmalar (crossing over), insersiyon ve delesyonlarla bu homoloji korunmuş ve bu homolog bölgeler X, Y ve Z alt ünitelerine ayrılmıştır (5,22). Y bölgesinde şimdiye kadar tanımlanmış bir çaprazlama bulunmamaktadır (5). 4.2 kb'lık ve 3.7 kb'lık delesyonlar sonucunda X ve Z bölgeleri arasında eşit olmayan çaprazlanmalar oluşabilir. Bu eşit olmayan çaprazlanmalarda  $-\alpha^{3.7}$  sağ tarafta meydana gelen delesyonları ve  $-\alpha^{4.2}$  sol taraftaki delesyonları göstermektedir (11,53,59,60).

3.7 kb uzaklıkta bulunan iki Z dilimi arasında gerçekleşen çaprazlanmalarda bir globin geni  $-\alpha^{3.7}$  ve üç globin geni  $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$  içeren kromozomların oluşumu ile sonuçlanır. Bu tip  $\alpha^+$ -talaseminin, çaprazlaşmanın Z parçasının neresinde gerçekleştiğine bağlı olarak üç ayrı türü ( $-\alpha^{3.7\ I}$ ,  $-\alpha^{3.7\ II}$ ,  $-\alpha^{3.7\ III}$ ) bulunmaktadır. Aynı şekilde 4.2 kb uzaklıkta bulunan çaprazlanmalar sonucunda  $\alpha$ - talasemi  $-\alpha^{4.2}$  ve  $\alpha\alpha\alpha^{4.2}$  kromozomlarının oluşumuna neden olmaktadır (5,11,14,22) (Şekil 12).

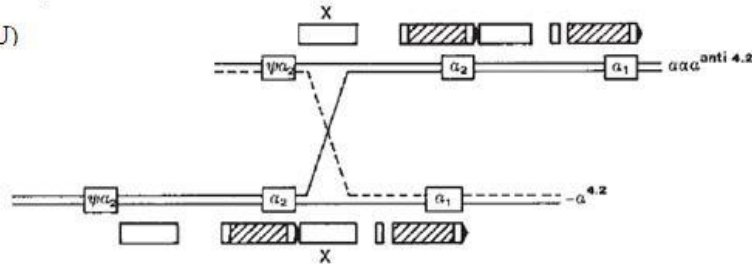
#### SAĞA DOĞRU ÇAPRAZLAMA

(Z KUTUSU)



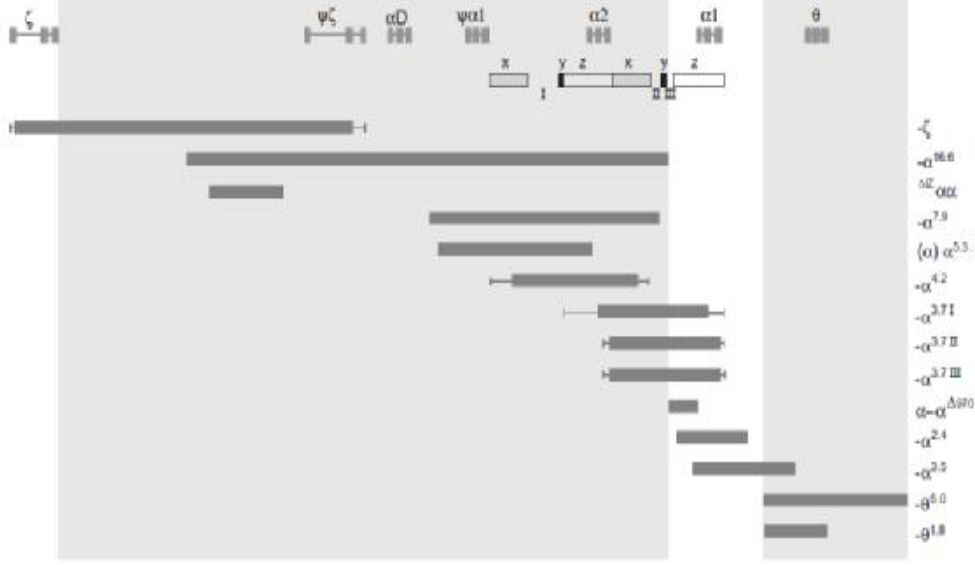
#### SOLA DOĞRU ÇAPRAZLAMA

(X KUTUSU)



Şekil 12.  $\alpha^+$  Talasemiye neden olan çaprazlamalar

Bu mutasyonlara ek olarak  $\alpha^+$  talasemilere neden olan nadir mutasyonlar da bulunmaktadır. Asya'da gözlemlenen  $-\alpha^{3.5}$  delesyonu  $\alpha_1$  geninin tamamını kapsamaktadır. İtalya'da gözlemlenen  $-\alpha^{5.3}$  mutasyonu  $\alpha_2$  geninin 5' ucunu kapsamaktadır (5,22,60).  $-\alpha^{2.7}$  kb'luk delesyon ise Çinde Hb H hastası olan bir bireyde rapor edilmiştir (14,22). Diğer nadir bir mutasyonda  $-\alpha^{2.4}$  kb büyüklüğündeki mutasyon olup, Kanadalı ve Çinli Hb H hastasında saptanmıştır. Birbirinden farklı büyüklükte toplam yedi nadir mutasyonun  $\alpha^+$  talasemilere neden olduğu Şekil 13' te görüldüğü gibi rapor edilmiştir (14).



Şekil 13.  $\alpha^+$  Talasemilere neden olan delesyonel mutasyonların büyüklükleri

#### 2.2.2.2.2. Delesyonel olmayan (Nondelesyonel) $\alpha$ –Talasemiler

$\alpha$  talasemiye neden olan mutasyonlar çoğunlukla delesyonel mutasyonlardır. “Non-delesyonel” mutasyonlar tek nokta mutasyonu, oligonükleotid insersiyonu ve delesyonu ile oluşur ve etkilenmiş alfa geni ( $\alpha^T$ ) olarak gösterilir (22). “Non-delesyonel”  $\alpha$  talasemi mutasyonları daha çok  $\alpha_2$  geninde ( $\alpha^T\alpha$ ) nadir olarak da  $\alpha_1$  geninde ( $\alpha\alpha^T$ ) görülmektedir (61).

“Non-delesyonel”  $\alpha$ -talasemi, ilk defa 1977 yılında Kan ve arkadaşları tarafından Hb H’lı bir hastada tanımlanmıştır (62). Günümüze kadar dünyada 69 adet tanımlanmış “non-delesyonel”  $\alpha^+$ -talasemi bildirilmiştir. Bilinen bu mutasyonların 46 tanesi  $\alpha_2$  geninde ( $\alpha^T\alpha$ ), 17 tanesi ise  $\alpha_1$  geninde ( $\alpha\alpha^T$ ) ve 5 tanesi ise  $-\alpha$  kromozomunda ( $-\alpha^T$ ) meydana gelmiştir (14).

Bazı non-delesyonel mutasyonlar,  $\alpha$ -globin gen ifadesinde delesyonel mutasyonlardan daha ciddi etkilere neden olurlar. Çünkü mutasyonların büyük çoğunluğu, gen ifadesinin daha baskın olduğu  $\alpha_2$  globin zincirinde meydana gelmektedir. Ayrıca delesyonel mutasyonlardan farklı olarak, nokta mutasyona bağlı olarak genlerden birinin inaktivasyonu sonucu diğer genin ifadesinde telafi edici bir yükselme gözlenmemektedir. Bazı nondelesyonel mutasyonların sonucunda,  $\alpha$  gen ifadesinin azalışıyla birlikte olan ikincil etkiler de

görülmektedir. Bu nedenle, nondelesyonel mutasyonların yaratabilecekleri patofizyolojik değişiklikler önemlidir (21,22).

Non-delesyonel  $\alpha$ -talasemiye; RNA “splicing”i etkileyen mutasyonlar, Poli A kuyruğu sinyalini etkileyen mutasyonlar, mRNA translasyonunu etkileyen mutasyonlar, Frameshift delesyonları ve zincir sonlanma mutasyonları neden olmaktadır (5,14).

#### 2.2.2.2.1. RNA “ Splicing”i etkileyen mutasyonlar

Bu grupta sekiz mutasyon tipi tanımlanmıştır. Bu mutasyonların beş tanesi  $\alpha_2$  globin geninde üç tanesi de  $\alpha_1$  globin geninde bulunmuştur. RNA “splicing”i etkileyen mutasyonlardan birisi ( $\alpha^{\text{IVS I, 5nt del}} \alpha$ )  $\alpha_2$  geninin IVS-I 5' donör bölgesinde beş nükleotidlik delesyon ile oluşmuştur. Bu talasemilerin heterozigotları  $\alpha$ -talaseminin “trait” fenotipine, homozigotları ise  $\alpha$  talasemilerin daha ciddi formlarına neden olurlar (5,14,22).

$\alpha_2$  geninin IVS-I akseptör bölgesinde görülen ( $\alpha^{\text{IVSI-116(A}\rightarrow\text{G)}} \alpha$ ) mutasyon ise, anormal splicing ile prematür sonlanma kodonu (kodon 31) oluşturan IVS-I'in tutulumuna sebep olur (5,14,22). Farklı bir “splicing”i etkileyen mutasyon da ilk defa Surinam ve Hindistan'da görülen ( $\alpha^{\text{Cd22 (C}\rightarrow\text{T)}} \alpha$ ) mutasyon tipidir. Bu mutasyon  $\alpha_2$  geninde 48. ve 49. kodonların arasında meydana gelen sessiz bir mutasyondur (14). Başka bir “splicing” bozukluğu  $\alpha_1$  geninin IVS-I bölgesinde 117. kodondaki mutasyondan ( $\alpha^{\text{IVSI-117(G}\rightarrow\text{A)}} \alpha$ ) kaynaklanmaktadır (22,63).

#### 2.2.2.2.2. Poli A kuyruğu sinyalini etkileyen mutasyonlar

AATAAA poli A dizisi 10-30 bç büyüklüğünde olup oldukça korunmuş bir yapıdır. Günümüze kadar poli A kuyruğu sinyalini etkileyen  $\alpha_2$  geninde dört mutasyon bulunmuştur. İlk poli A kuyruğu mutasyonu Arap toplumlarında gözlenen (AATAAA $\rightarrow$ AATAAG,  $\alpha^{\text{PA6:A}\rightarrow\text{G}}$ ) mutasyonudur. Bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bireylerde  $\alpha$ -talaseminin “trait” formu, homozigot olarak taşıyan bireylerde ise Hb H formu görülmektedir. Ancak bu mutasyonun dışında  $\alpha_2$  geninin inaktivasyonuna neden olan poli A kuyruğu mutasyonları her zaman Hb H'a neden olmazlar.  $\alpha^{\text{PA6:A}\rightarrow\text{G}}$  mutasyonu  $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$  genlerinin düzenlenmesini kontrol ettiği bilinmektedir (14,22).

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) ile yapılan analizler neticesinde  $\alpha^{PA6:A \rightarrow G}$  mutasyonunun en az iki etkisinin olduğu gösterilmiştir.  $\alpha_2$  mRNA miktarı azalmakta, ayrıca poli A kuyruğunun etkilenmesinden dolayı  $\alpha_1$  geni de etkilenmektedir (14,22).

#### 2.2.2.2.2.3. mRNA translasyonunun başlamasını etkileyen mutasyonlar

Non-delesyonel mutasyonlardan bazıları mRNA'nın translasyonunu etkiler ve bu mutasyonlardan altı tanesi başlama dizisini (CCRCCATG) bozar. Bunlardan bir tanesi ( $-\alpha^{IN:ATG \rightarrow GTG} \alpha$ ) mRNA'nın translasyonunu ortadan kaldırır. Bu mutasyon, ikinci  $\alpha$  talasemi mutasyonu ile birlikte bir olguda ( $-\alpha^{IN:ATG \rightarrow GTG} / -\alpha$ ) tanımlanmıştır. Bu bireyin % 2.4-7.2 oranda Hb H içerdiği ve Hb H hastalığının tipik hematolojik görünümüne sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer bir olgu ise başlama dizisinden 2 bç'lik delesyonun olduğu ( $-\alpha^{IN:2b\check{c}del} \alpha$ ) mutasyon tipidir ve bu mutasyonda mRNA translasyonu %30-50 oranında azalmaktadır. ( $-\alpha^{IN:2b\check{c}del} / -\alpha^{IN:2b\check{c}del}$ ) homozigot bir olguda hafif hipokromik mikrositer anemiyle (Hb:9,7-9,9; MCV:63; MCH:18-20) birlikte Hb H'nin varlığı gösterilmiştir (14,22).

$\alpha^{IN:ATG \rightarrow ACG} \alpha$  mutasyonunun homozigot formunun gözleendiği olgularda, alfa talaseminin şiddetli klinik seyri gözlenmiştir. Bu mutasyonun heterozigot formlarında %8-24 oranında Hb H oluştuğu bildirilmiştir (14,22).

$\alpha\alpha^{IN:ATG \rightarrow GTG}$  mutasyonu  $\alpha_1$  geninin ifadesi olan mRNA'nın translasyonunu ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bir ailede gözlenen birleşik heterozigot ( $--/\alpha\alpha^{IN:ATG \rightarrow GTG}$ ) yapı, göreceli olarak daha düşük Hb H (%1.5-3) oluşumuna neden olmuştur (14,22).

Eng ve ark. tarafından yapılan çalışmada başlatma kodonunda farklı bir delesyon ( $\alpha^{IN:ATG \rightarrow -TG}$ ) tanımlanmıştır. Yeni doğan bir bebekte tanımlanan bu mutasyonun yanında –SEA mutasyonu da bulunmuş ve doğduğunda %25'ten fazla Hb Bart's içerdiği ve Hb H'nin de var olduğu bildirilmiştir (14).

#### 2.2.2.2.2.4. Frameshift delesyonları

Bu kategori de dört farklı mutasyon tanımlanmış olup bu mutasyonlar üçlü kodonların içinde tek bir baz değişikliği ile prematüre sonlanma kodonu yaratırlar. Bu durumda alfa globin zincirinin translasyonu erken sonlanır. Üçlü kodonlarda tek bir bazın

insersiyosunu ya da delesyonu ile ya prematüre sonlanma kodonu ya da anormal hemoglobinler oluşmaktadır. İran'da sık gözlenen  $\alpha^{cd19;delG}$   $\alpha$  talasemi mutasyon tipi buna örnektir (14).

Diğer bir mutasyon tipi ise 1988 yılında Safaya ve Rieder tarafından siyah bir Amerikalı'da gösterilmiştir. Hb H hastalığı ve Hb G Philadelphia'sı olan bu bireyde sadece  $\alpha^G$  zinciri üretilmektedir ( $-\alpha/-\alpha^G$ ), fakat  $\alpha^A$  zinciri üretilmemektedir. Safaya ve arkadaşları  $-\alpha$  kromozomunun bu durumuna daha uzaktaki bir mutasyonun neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda kodon 30 veya kodon 31'de iki nükleotidin delesyonunun (GAG veya AGG) sonucunda oluştuğu gözlemlenmiştir. İki nükleotidlik delesyonla oluşan frameshift mutasyonu ekzon II'de kodon 31 ile kodon 54 arasında yeni bir dizinin ortaya çıkmasına hatta 55. kodonda yeni sonlanma kodonunun (TAA) oluşmasına neden olmuştur. Bu mutasyon  $-\alpha^{cd30/31;del2bc}$  tipi  $\alpha^0$  talasemi olarak tanımlanmıştır (5,14).

Ayala ve arkadaşları tarafından İspanyol bir ailede  $\alpha_1$  geninde tanımlanan  $\alpha\alpha^{cd51-55;13bc\ del}$  /  $\alpha\alpha$  mutasyon tipinin alfa talasemi "trait"e neden olduğu, bu mutasyonun 62. kodonda yeni bir durdurma sinyali oluşturduğu gösterilmiştir (5,14).

Diğer bir başka mutasyon tipi ise,  $\alpha_2$  geninde meydana gelmekte ve kodon 113 ile kodon 116 da 12 nükleotidin delesyonu ile dört amino asitin kaybına yol açmaktadır. Normal bir bireyde alfa globin zincirinde 141 amino asit bulunurken bu mutasyonu taşıyan bireylerde 137 amino asit bulunmaktadır. Böylece hemoglobin molekülünün tetramer yapısı bozulmaktadır. Bu mutasyonun heterozigot formları bireylerde Hb "trait"e neden olmaktadır (5,14).

Bugüne kadar saptanan frameshift mutasyonları ve bunlarla birlikte gözlenen mutasyonlara bağlı olarak ya Hb "trait"e ya da Hb H gözlenmektedir (14).

#### 2.2.2.2.5. Zincir sonlanma mutasyonları

$\alpha_2$  globin geninin normal sonlanma kodonunda (TAA) dokuz farklı tek nükleotid değişimi bulunmuştur. İki mutasyon (TAG ve TGA) anlamsız sonlanma kodonu oluşturmuştur. Sonlanma kodonundaki bir tek baz değişikliği sonucunda mRNA'nın translasyonu bir sonraki poli A kuyruğundaki (AAUAAA) sonlanma kodonuna kadar devam



ettiği gösterilmiştir.  $\alpha_2$  globin geninde altı mutasyon bulunmuş ama bunlardan ancak beş tanesi tanımlanmıştır. Sonlanma kodonundaki mutasyon sonucunda uzamış olan alfa globin zincirindeki 142. amino asitlerin farklılığı ile Hb Constant Spring ( $\alpha$  142 Gly), Hb Icaria ( $\alpha$  142 Lys), Hb Koya Dora ( $\alpha$  142 Ser), Hb Seal Rock ( $\alpha$  142 Glu) ve Hb Paks ( $\alpha$  142 Tyr) diye adlandırılan hemoglobin varyantları oluşmaktadır (14).

Bu mutasyonların, MCV değerlerini düşürmediği aksine heterozigot olgularda MCV değerlerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Homozigot Hb Constant Spring (CS) olgularında klinik seyrin şiddetli olduğu, ayrıca heterozigot Hb Constant Spring ile  $\alpha^0$  birlikteliğinde Hb H olgularının klinik seyrinin beklenmedik bir biçimde şiddetli olduğu rapor edilmiştir. Non-delesyonel mutasyonların neden olduğu alfa talasemi tipleri Tablo 4'te verilmiştir (14).

**Tablo 4.** Alfa talasemiye neden olan non-delesyonel mutasyonların listesi

Etkilenen Dizi	Gen	Mutasyon	Ülke veya Irk	Fenotip
<i>mRNA İşleme Mutasyonları</i>				
Gizli splicing	$\alpha_2$	Cd22; C→T	Surinam	$\alpha^+$
IVS(donör)	$\alpha_2$	IVS I; del 5bç	Akdeniz	$\alpha^+$
IVS(donör)	$\alpha_1$	IVS I; (G→A)	Tayland	$\alpha$
IVS(donör)	$\alpha_2$	IVS II; 2(T→A)	Kuzey Avrupa	$\alpha^+ - \alpha^0$
IVS(akseptör)	$\alpha_2$	IVSI; 116 (A→G)	Hollanda	$\alpha^+$
IVS(akseptör)	$\alpha_1$	IVS I; 117 (G→A)	Asya, Hindistan	$\alpha^+$
IVS(akseptör)	$\alpha_2$	IVSII;142 (G→A)	Arjantina	$\alpha^+ - \alpha^0$
IVS(akseptör)	$\alpha_1$	IVSII;148 (A→G)	İran	$\alpha^+$
Poli A kuyruğu	$\alpha_2$	PA; del 16bç	Arap	$\alpha^+ - \alpha^0$
Poli A kuyruğu	$\alpha_1$	PA6; A→G	Orta Doğu, Akdeniz	$\alpha^+ - \alpha^0$
Poli A kuyruğu	$\alpha_2$	PA4; A→G	Akdeniz, Çin	$\alpha^+ - \alpha^0$

Poli A kuyruğu	$\alpha_2$	PA; del 2bç	Asya, Hindistan, Tayland	$\alpha^+ - \alpha^0$
<i>mRNA Translasyonu Mutasyonları</i>				
Başlatma kodonu	$-\alpha^{5,7}$	IN; ATG→GTG	Afrika	$\alpha^0$
Başlatma kodonu	$-\alpha^{5,7II}$	IN; del 2bç	Kuzey Afrika , Akdeniz	$\alpha^+ - \alpha^0$
Başlatma kodonu	$\alpha_2$	IN; ATG→ACG	Akdeniz	$\alpha^+$
Başlatma kodonu	$\alpha_2$	IN; ATG→A-G	Vietnam	$\alpha^+$
Başlatma kodonu	$\alpha_1$	IN; ATG→GTG	Akdeniz	$\alpha^+$
Başlatma kodonu	$\alpha_2$	IN; ATG→-TG	Güneydoğu Asya	
Ekzon I	$\alpha_1$	cd 14; G→A	İran	$\alpha^0$
Ekzon I	$\alpha_2$	cd 19; del G	İran	$\alpha^+$
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd22; del C	Afrika	
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd 23; G→T	Tunus	$\alpha^0$
Ekzon I	$-\alpha$	Cd 30/31; del 2bç	Afrika	$\alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 39/41; del/ins	Yemenli Musevi	$\alpha^+$
Ekzon II	$\alpha_1$	Cd51-55; del 13bç	İspanya	$\alpha^+$
Ekzon II	$\alpha_1$	Cd62; del G	Afrika	
Ekzon II	$\alpha_1$	Cd 78; del C	Siyahlarda, Çinlilerde	
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 90; A→T	Ortadoğu	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_1$	Cd108; delC	Musevi	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd113/114; delC	Bilinmiyor	
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd113/116; del12bç	İspanya	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd116; G→T	Afrika	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_1$	Cd131; ins T	Tayland	$\alpha^0$
Sonlama Kodonu	$\alpha_2$	TER;TAA→CAA(ConstantSpring)	Güneydoğu Asya	$\alpha^+$
Sonlama Kodonu	$\alpha_2$	TER; TAA→AAA (Icaria)	Akdeniz	$\alpha^+$
Sonlama Kodonu	$\alpha_2$	TER; TAA→TCA (Koya Dora)	Hindistan	$\alpha^+$
Sonlama Kodonu	$\alpha_2$	TER;TAA→GAA (Seal Rock)	Afrika	$\alpha^+$
Sonlama Kodonu	$\alpha_2$	TER; TAA→TAT (Pakse´)	Loatian Tayland	$\alpha^+$
<i>Translasyon Sonrası Mutasyonlar</i>				
Ekzon I	$-\alpha$	Cd14;T→G	Afrika	$\alpha^+$
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd21; G→T	Hollandalı	$\alpha^+$
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd29; T→C	Akdeniz	$\alpha^+$
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd30; 3bç(del Q)	Çin	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon I	$\alpha_2$	Cd31; G→A (R-L)	Çin	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 32; G→A (Amsterdam, M-I)	Surinam-Siyah	$\alpha^+$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 35; T→C (Evora, S-P)	Filipin Portekiz	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 35; T→C (Chartres, F-S)	Fransa	$\alpha^+$

Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 37; del3bç(Heraklion, del P)	Yunanistan	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 59; G→A (Adana, G-D)	Türkler	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 60/61; del3bç (Clinic, del K)	Ispanya	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd62; del3bç(AghiaSophia, del V)	Yunanistan	$\alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 64-74; del 33bç	Yunanistan	$\alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 66; T→C (Dartmouth, L-P)	Kafkas	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 93; T→G (Bronte, V-G)	İtalya	$\alpha^+$
Ekzon II	$\alpha_2$	Cd 93-99; dupl 22bç	İran	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd103; A→T (Hb Bronovo, H-L)	Türkler	$\alpha^+ - \alpha^0$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd104; G→A (Sallanches, C-Y)	Fransa, Pakistan	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_1$	Cd104; T→A (Hb Oegstgeest, C-S)	Surinam	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd108; C→A (Hb Bleuland, T-N)	Surinam	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd109; T→G (Suan Dok, L-R)	Tayland	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha$	Cd110; C→A (Petah Tikva, A-D)	Orta Doğu	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_1$	Cd119; C→T (Groene Hart )	Fas	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd 125; T→C (Quong Sze, L-P)	Çin	$\alpha^+$
Ekzon III	$-\alpha^{3,7}$	Cd125; T→A (L-G)	Musevi	$\alpha^0$
Ekzon III	$\alpha_1$	Cd129; T→C (Tunis-Bizerte, L- P)	Tunus	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd 129; T→C (Utrecht, L-P)	Hollanda	$\alpha$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd 130; G→C (Sun Prairie, A-P)	Asya, Hindistan	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd131; T→C (Questembert, S-W)	Fransa, Yugoslavya	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd132; T→G (Caen, V-G)	Kafkas	$\alpha^+$
Ekzon III	$\alpha_2$	Cd 136; T→C (Bibba, L-P)	Kafkas	$\alpha^+$

#### 2.2.2.2.3. $\alpha$ - Talasemilerin klinik tablosu

$\alpha$  talasemiler,  $\alpha$  globin zincir sentezininin azalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Fenotipik olarak alfa talasemi dört kategoride incelenebilir, bunlardan ilki sessiz taşıyıcı olarak tanımlanan bir alfa globin zincirinin kaybı ve dolayısıyla üç işlevsel alfa globin zincirinin varlığı ile karakterizedir. Diğeri ise iki alfa globin zincirinin kaybı ve iki işlevsel alfa globin zincirinin bulunduğu Hb “trait”tir. Üç alfa globin zincirinin kaybı ve sadece bir işlevsel alfa globin zincirinin bulunduğu talasemi formunu da Hb H hastalığı olarak ifade edilmektedir. Hiçbir işlevsel alfa globin zincirinin bulunmadığı dördünün de kaybedildiği durum ise Hemogloblin Bart’s olarak ifade edilmektedir (11,14).

Normal bireylerin retiküositlerinde  $\alpha/\beta$  globin zincirlerinin oranı 1'e eşittir. Ancak alfa talasemilerin meydana gelmesi ile bu oran; sessiz taşıyıcılarda 0.8'e, "trait"te 0.6'ya, Hb H'da 0.3'e ve Hemoglobin Barts'ta 0'a kadar düşmektedir (11).

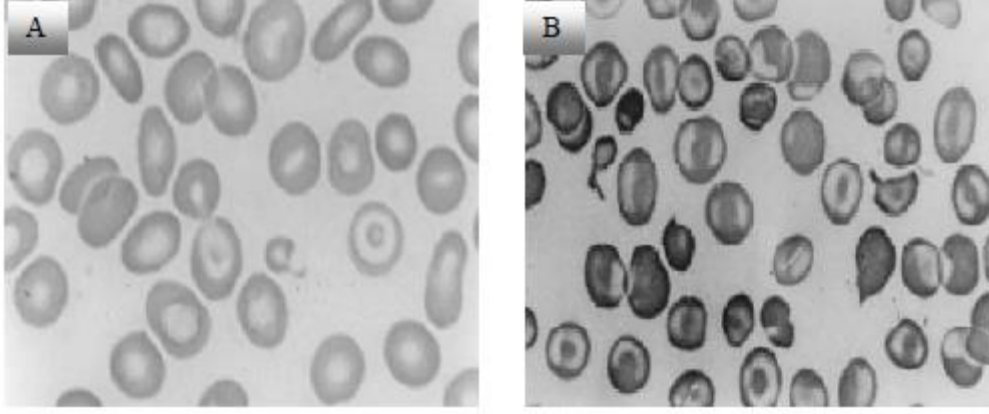
#### 2.2.2.2.3.1. Sessiz taşıyıcı

Bir allel üzerinde sadece tek alfa genini içine alan (-3.7 kb ve -4.2 kb) delesyonlar var ise ( $\alpha$ -tal-2:  $-\alpha/\alpha$ ) sessiz alfa talasemi taşıyıcılığı şeklinde ifade edilmektedir. 3.7 kb büyüklüğündeki delesyon tüm dünyada en sık karşılaşılan alfa talasemi mutasyonudur. Bu delesyonlardan birine sahip olan kişiler tamamen sağlıklı olup kan sayım sonuçları ile taşıyıcı olduklarını belirlemek genellikle zordur. Hematolojik bulgularda bu kişilerde hemoglobin konsantrasyonu normal, MCV 70-80 fl arasında, MCH ise sınırda veya düşük olabilir. Retiküositlerdeki  $\alpha/\beta$  zincirlerinin oranları normale yakındır (11,54).

#### 2.2.2.2.3.2. Hemoglobin Trait

$\alpha$ - talasemi "trait"te, iki  $\alpha$ - globin geninin kaybı ve işlevsel iki  $\alpha$ -globin geninin ise korunması ile ifade edilmektedir. Bazı mutasyonların homozigot formları bazılarının ise heterozigot formu ( $-\alpha/-\alpha, -\alpha/\alpha^T$  ve bazen de  $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ) hemoglobin traitin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu tip alfa talaseminin en sık nedeni 3.7 kb'lık delesyonun homozigot ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) formudur.  $-\alpha^{5.2}$  ile  $-\alpha^{20.5}$  arasında yer alan büyük delesyonlar da bu tip alfa talaseminin oluşmasına neden olmaktadır. Hemoglobin "trait"li bireylerde genellikle anlamlı mikrositoz, artmış kırmızı hücre sayısı ve hissedilebilir  $\alpha/\beta$  zincirlerinin oranlarında azalma söz konusudur (11,14,54).

$\alpha$ - talasemi "trait"te, doğumda %5-15 oranında hemoglobin Bart's görülmektedir. Bu hemoglobin matürasyonu sırasında ortadan kalkmakta yerini aynı miktarda Hb H almaktadır. Periferik yaymada bazen Hemoglobin H inklüzyon cisimcikli hücre Şekil 14'te görülmektedir. Bu fenomen sıklıkla  $\alpha$ - talasemi "trait" için tanısal bir test olarak kullanılmaktadır (11,14,54).



Şekil 14. A) Hemogloblin “trait”li bir hastanın periferik yayması

B) Bazı hemogloblin “trait”li hastalarda görülebilecek inklüzyon cisimcikli hücre

#### 2.2.2.2.3.3. Hemogloblin H

Hemogloblin H hastalığı  $\alpha$  globin zincirlerinden birinin nokta mutasyonu ya da küçük delesyonu veya insersiyonu ile sonuçlanan  $\alpha^+$  talasemi ile  $\alpha^0$  talaseminin birlikte görülmesi sonucunda üç işlevsel alfa globin zincirinin kaybı ( $--/\alpha$ ) ile karakterize edilir (64). Yalnızca delesyonlarla oluşan tipinin yanı sıra, daha az sıklıkta görülen diğer Hb H genotipleri, delesyonel ve nondelesyonel bozuklukların birlikte kalıtımını ( $--/\alpha^T$ ) ve nondelesyonel bozukluğun homozigotluğunu ( $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$  veya  $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ) kapsamaktadır (11,33).

Hb H hastalığında  $\alpha$ -globin zinciri ve  $\alpha$ -globin mRNA üretimi azalmaktadır. Buna bağlı olarak  $\alpha/\beta$  globin mRNA oranı genelde 0.5’in altına düşmektedir. Ancak bazı olgularda bu oranın 0.7 ile 0.2 arasında değiştiği bildirilmiştir (14,64,67).

Fetal dönemde bireylerde aşırı  $\gamma$  globin zinciri sentezlenir ki bu da  $\gamma_4$  tetrameri ile karakterize Hb Bart’sı oluştururken, yetişkin dönemde aşırı  $\beta$  globin zincir sentezi  $\beta_4$  tetrameri ile karakterize edilen Hb H’ı oluşturur. Bu homotetramerler; yüksek oksijen affinitesine sahiptirler, hem-hem etkileşimleri azdır ve dokulara daha az miktarda oksijen taşınmasına neden olurlar (64).

Hemogloblin H çoğunlukla talasemi intermedia kliniği göstermekte ancak mutasyonların çeşitliliğine bağlı olarak klinik seyir de değişken olabilmektedir (13,14,17). Bu

hastalarda mikrositoz, 8-10 g/dl arasında değişebilen hemoglobin düzeyine sahip hafiften orta şiddete kadar varan anemi gözlenmektedir. Kan tablosunda eritrositlerinde hipokromi görülmektedir (11). Bunların dışında bireylerde splenomegali, safra taşı oluşumu, folik asit eksikliği ve bacak ülserleri gibi komplikasyonların meydana geldiği rapor edilmiştir (68). Klinik olarak genelde derin bir anemiye sahip olmayan Hb H hastaları kan transfüzyonuna gerek duymadan hayatlarını sürdürebilirler. Ancak bir enfeksiyon veya diğer nedenlerle birlikte olduğu durumlarda kan almaları gerekebilir (51).

Hb H hastalığı Güneydoğu Asya, Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. Özellikle Güneydoğu Asya ve Çin'in güneydoğusunda yüksek frekansta (--<sup>SEA</sup>) mutasyonu ve daha az sıklıkta (--<sup>FIL</sup>) mutasyonu görüldüğünden bu bölgelerde Hb H'nin frekansı yüksektir (64).

#### 2.2.2.2.3.4. Hemoglobin Bart's

Hb Bart's sendromu, dört alfa globin geninin tamamının kaybı (--/--) ile karakterize edilmektedir. Bu bireyler, orta ya da geç gestasyonel dönemde fetusun ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bu sendrom daima delesyonel mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu infantlardaki başlıca hemoglobin olan Hb Bart's dört  $\gamma$  ( $\gamma_4$ ) zincirinden oluşmaktadır. Delesyondan korunmuş  $\zeta$ -globin geninin ekspresyonu, fetüsü orta gestasyondan geç gestasyona taşıyan yeterli işlevsel hemoglobin tetramerlerinin [Hb Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ )] sentezini sağlamaktadır. Doğumda ortalama gestasyonel yaş 32 hafta kadardır. İnfantların yaklaşık %50'si ölü doğmakta ve geriye kalanı da doğumdan birkaç saat sonra ölmektedir (11,55). Güneydoğu Asya ülkelerinde hemoglobin "trait"(--/aa) frekansı %4-14 olduğundan 200 doğumdan birinde Hb Bart's (--/--) görülmektedir (14).



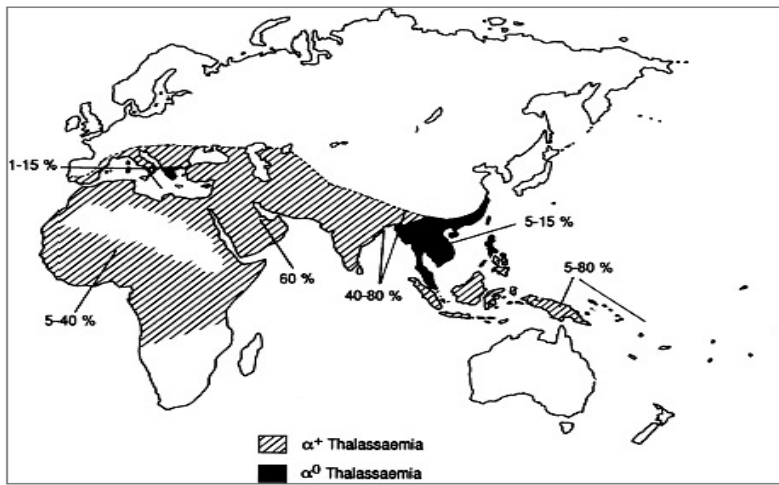
#### 2.2.2.2.4. $\alpha$ -Talasemilerin coğrafik dağılımı ve insidansı

Hemoglobinlerin üretimlerinde ya da yapılarında meydana gelen bozukluklarla ifade edilen hemoglobinopatiler, malaryadan kaynaklı ölümlere karşı bireyleri korumaktadır (69,70). Dünya'daki  $\alpha$ -talasemi dağılımı *Plasmodium falciparum* malarya ile yakından ilişkilidir. 1946 yılında Haldane tarafından yapılan bir çalışmada talaseminin tropikal bölgelerde yaygın olduğu ve talasemi taşıyıcılarının malaryaya karşı direnç gösterdiği rapor edilmiştir (11).

Malaryaya karşı doğal elemanın hemoglobinopatileri arttırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Sıtmanın yaygın olduğu bir bölgede predominant mutasyon olarak  $-\alpha^{3.7III}$  tipinin bulunması malarya ve  $\alpha$ - talasemi ilişkisini desteklemektedir (11).

##### 2.2.2.2.4.1. Dünya'da $\alpha$ - talasemi insidansı

$\alpha$ -talasemiler dünyada en yaygın kalıtsal kan hastalığı olarak bilinmektedir (14,22,68). En çok tropikal bölgelerde görülen  $\alpha$ - talasemiler, malaryanın görüldüğü ülkelerde insidansın yüksek olduğu bilinmektedir. 1946 yılında Vezzoso yaptığı çalışmada İtalya'da talasemi dağılımının malarya dağılımı ile aynı olduğunu rapor etmiştir (2). Ülkemizi de içine alan Doğu Akdeniz bölgesinde hemoglobinopati taramasında  $\alpha$ -talasemi sıklığının bu bölgelerde yüksek olduğu rapor edilmiştir (22). Dünyada Akdeniz, Ortadoğu, Hindistan, Çin ve Güneydoğu Asya'da  $\alpha$ -talasemi yaygın olduğu Şekil 16'da gösterilmiştir (71).



Şekil 16. Dünyada alfa talasemi insidansı



$\alpha^0$  -talasemi Akdeniz ülkelerinde ve Asya toplumlarında daha sıklıkla bulunmakta, Afrika ve Ortadoğu'da ise daha az gözlenmektedir.  $\alpha^+$ -talaseminin delesyonel formları daha çok Batı Afrika, Akdeniz, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya'da görülmektedir. Buna karşın  $\alpha^+$  talaseminin nondelesyonel formuna daha çok körfez ülkelerinde rastlanmaktadır. Bu ülkelerde çok sayıda klinik seyri ağır olan Hb H hastalarına da rastlanmaktadır (22).

Siyah Amerikalılarda da  $\alpha$ -talaseminin insidansı yüksek bulunmuş fakat klinik açıdan çok önemli olmadıkları rapor edilmiştir (11, 22).

#### 2.2.2.2.4.2. Türkiye'de $\alpha$ -talasemi insidansı

Türkiye'de yapılan çalışmalarda  $\alpha$  talasemi taşıyıcı sıklığının %2 oranında olduğu rapor edilmiştir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda ise beş tür delesyon saptanmıştır. Bunlardan üçü (26.5kb, 20.5kb ve 17.4 kb) aynı allel üzerindeki  $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$  genlerini içine alan ağır alfa talasemi taşıyıcıları ( $\alpha$ -tal-1: --/ $\alpha\alpha$ ) diğer ikisi (-3.7 kb ve -4.2 kb) ise sadece bir alfa genini içine alan ( $\alpha$ -tal-2: - $\alpha$ / $\alpha\alpha$ ) sessiz alfa talasemi taşıyıcılarıdır.  $\alpha_2$  geni üzerindeki nondelesyonel alfa talasemi mutasyonlarından Akdeniz ülkelerine spesifik olanlar PA1: AATAAAA→AATGAA ve PA2: AATAAA→AATAAG ile IVS1'in donör kısmındaki 5 nükleotidlik delesyon (-TGAGG) ülkemizde de görülmüştür.  $\alpha_1$  geni üzerinde (Cod 59 GGC→GAC: Gly→Asp ) bulunan ve G→A değişimi ile meydana gelen dayanıksız Hb Adana varyantı da alfa talasemiye neden olmaktadır. Hb Adana ve Poly A (PA2) mutasyonları ilk kez Türkiye'de HbH hastalarında tanımlanmıştır (42,51).

Türkiye de yapılan iki farklı çalışmada Hb SS ile  $\alpha$ -talaseminin birlikte kalıtıldığına dair veriler bulunmaktadır. Eti Türklerinde yapılan çalışmada Hb SS ve  $\alpha$ -talasemi insidansı %17 olarak ifade edilmiştir (72,73).

#### 2.2.2.2.4.3. Kahramanmaraş'ta $\alpha$ -talasemi

Kahramanmaraş'ta bulduğumuz hemoglobinopati taşıyıcılığı oranı Türkiye ortalamalarına yakın, ancak taşıyıcılık oranları, diğer Akdeniz bölgesi genelindeki oranlardan oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedeni anormal hemoglobinlerin etnik yapı ve bölgeye

göre değişmesi ve Kahramanmaraş'ın bölge olarak Doğu Akdeniz'de yer almasına rağmen etnik olarak diğer Akdeniz bölgelerinden farklı olması olabilir (111).

### 2.3. Talasemi ve Transferrin Reseptörü

Demir; hemoglobin, miyoglobin, sitokrom C ve bazı enzimlerin yapılarının meydana gelmesinde önemli bir role sahip olduğundan temel bir bileşen olarak kabul edilir. Bu nedenle bazı ciddi hastalıklar demir eksikliğinin bir sonucu olarak gelişebilir (74).

Demir aktarımı transferrin reseptörü (TfR) ile sağlanır. Bu molekül tüm vücut hücrelerinin yüzeyinde, özellikle kırmızı kan hücrelerinde bulunan, 190 kDa'lık bir ağırlığa sahip membran proteinidir. Bu reseptör transferrin II molekülüne bağımlıdır, bu yüzden transferrin II molekülü ve reseptör yapışır, plazma membranında transferrin II molekül-reseptör kompleksi oluşur ve kompleks hücre içine girer (74). Azalan pH ile demir kompleksten ayrılır ve sonuç olarak TfR'ın bağımlılığı apoferritin için artmıştır. Bu nedenle endosomda oluşan reseptör- apoferritin kompleksi hücre membran yüzeyine geri döner. Ekstrasellüler sıvıda pH'ın yükselmesiyle apoferritin TfR'dan ayrılır. Böylece TfR başka bir transferrin II molekülüne bağlanmaya hazırdır. Bu döngü sıkça tekrarlanır ve böylece hücrenin demiri gereken seviyede kalır (74). TfR üretim hızı, doğrudan hücrenin demir talebi ile ilgilidir. Aslında hücrede TfR'ın oluşumunu düzenleyen demir miktarıdır (74,75).

Anemi de kemik iliğinde artmış hematopoetik aktivite sonucu serum transferrin reseptörü (sTfR) konsantrasyonu değişir (76,77). Bu ölçütteki bir artış demir eksikliği anemisinden daha fazladır. Serum veya plazma içindeki bu reseptörün konsantrasyonundaki değişim demir eksikliğinin süresi ve şiddeti ile ilgilidir. Aneminin diğer türlerinde de bu molekülün salınımındaki artış nedeniyle kemik iliği hematopoetik aktivitesinde de bir artış beklenir. Bu nedenle artmış ölçütler talasemiye kanıttır. Vücutta demir koşulu üç göstergeye göre tahmin edilmektedir:

- 1) Dokularda depolanan demirin göstergesi serum ferritin ölçülerek tanımlanır,
- 2) Metabolik demir, kırmızı kan hücrelerinin Hb konsantrasyonunun ölçülmesi ile tanımlanır,
- 3) Demir transferinin indeksi, toplam demir bağlama kapasitesi (TDBK) ve sTfR toplamı ile tanımlanır.

İnflamatuvar, enfeksiyöz ve malign gibi hastalıklarda akut faz proteinleri nedeniyle TDBK ve ferritin seviyelerinde artış görülebilir. Bu nedenle, vücut demir durumunu değerlendirmek için alternatif bir yöntem göz önüne alınması gerekmektedir. Tercih edilen yöntem kemik iliği örneğinin Prusya mavisi ile boyanmasıdır (74).

Kemik iliği aspirasyon yöntemi tanının belirlenmesinde tercih edilen bir yöntemdir ancak deneyimli eleman eksikliği bu yöntemi sınırlandırmaktadır. Diğer bir alternatif, invazif olmayan bir yöntem olan sTfR konsantrasyonunun ölçülmesidir. Demir fazlalığı kalp, karaciğer, beyin, pankreas ve eklemler de zehirli olmasından dolayı talasemi olabileceği düşünülen kişilerde demir ölçümü önemlidir. Bu nedenle demir tabletleri bu tür insanlarda gereksiz tedavidir ve tam teşhisin konmasını önler (74, 78).

#### **2.4. Talasemi ve Hemoglobinopatilerin Tanı ve İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Talasemi ve hemoglobinopatilerin tanısında kullanılan yöntemler, klinik hematolojik özelliklerin incelenmesi, DNA analiz yöntemleri ve mRNA analizi olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Bir hastanın talasemik bir durumunun olup olmadığını belirlemek için başvurulan en yaygın yöntem, klinik laboratuvarlarda hastanın hematolojik özelliklerinin belirlenmesidir. Bu incelemeler, protein düzeyindedir. Diğer yöntem, hastalığa neden olan genetik bozuklukların DNA analiz yöntemleri ile belirlenmesidir. Üçüncü yöntemde ise, retikülositlerden izole edilen mRNA analiz edilerek mutasyonun gen ifadesini ne şekilde etkilediği gösterilir.

##### **2.4.1. Klinik hematolojik özellikler**

Klinik hematolojik özelliklerin incelenmesi, periferik kan örneğinin otomatik aletler sayesinde analiz edilmesi ile yapılır. Bu tür testlerden elde edilen bulgular, şöyle sıralanabilir:

A) Kanın Tamamındaki Hemoglobin Konsantrasyonu: Bu testte, eritrositler parçalanarak içlerindeki hemoglobinin tüm örneğe eşit olarak dağılması sağlanır. Daha sonra hemoglobin, kimyasal yollarla, daha stabil ve ölçülmesi daha kolay olan siyanomethemoglobine dönüştürülerek kolorimetre ile ışık absorbanı ölçülür ve miktarı

hesaplanır. Hemoglobin konsantrasyonu, yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişir. Erkeklerde kadınlardan; erişkinlerse ise çocuklardan daha yüksek hemoglobin konsantrasyonu görülür. Normal aralıklar, genç, erişkin bir kadın için 12-16 g/dl; erişkin erkek için ise 14-18 g/dl'dir.

B) Eritrosit sayısı: Bu testte, tüm kanın ünite hacmindeki kırmızı kan hücresi (RBC) sayısı verilir. Normal değerler, kadınlar için  $4.2-5.4 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ; erkekler için  $4.7-6.1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ 'dir.

C) Hematokrit: Paketlenmiş hücre hacmi (packed cell volume, PCV) olarak da adlandırılan bu yöntemde, örnekteki toplam eritrosit hacminin toplam kan hacmine olan oranı ölçülür. Normal değerler, kadınlarda 0.47 l/l; erkeklerde 0.42-0.52 l/l olarak belirlenmiştir.

D) Eritrosit İndisleri: Yukarıda anlatılan üç ana rbc ölçümü, aritmetik olarak eritrosit indislerinin (mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) türetilmesinde kullanılırlar. Bu değerlerin ve hesaplanmaları şöyle yapılır:

1. MCV (Mean Corpuscular Volume): örnekte belirlenen gerçek eritrosit hacmidir. Değeri, hacim birimi femtolitre ( $10^{-15}$  litre) olarak ifade edilir. Hesaplama, şu formül kullanılarak yapılır:

$$\text{MCV} = \text{hematokrit} / \text{rbc sayısı}$$

Özel birimler kullanıldığı zaman, hesaplama faktörlerinin de göz önüne alınması gerekir bu durumda, formül aşağıdaki gibi olur:

$$\text{MCV (fl olarak)} = \text{hematokrit [l/l]} \times 1000 / (\text{rbc sayısı [milyon/ } \mu\text{l]})$$

Normal MCV değerleri, 80-94 fl. dir.

2. MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin): Kırmızı kan hücreleri içindeki hemoglobinin gerçek kütesidir ve kütle birimi pikogram ( $10^{-12}$  gram) şeklinde ifade edilir. Hesaplanması için, aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{MCH (pg olarak)} = (\text{hemoglobin [g/dl]} \times 10) / (\text{rbc sayısı [milyon / } \mu\text{l]})$$

MCH için normal değerler, 27-31 pg'dır.

3. MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration): Kırmızı kan hücrelerindeki gerçek hemoglobin konsantrasyonudur. Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\text{MCHC (g/dl)} = \text{hemoglobin (g/dl)} / \text{hematokrit (l/l)}$$

MCHC'si normal olan hücreler, normokromik, yüksek olanlar hiperkromik, düşük olanlar ise hipokromik olarak belirtilir. Normal MCHC değerleri, 32-36 g/dl'dir (79,80).

**Tablo 6:** Klinik hematolojik bulgular için normal değerler

	Erkek	Kadın	Kadın ve Erkek
RBC	4.7 - 6.1	4.2 - 5.4	
Hemoglobin (g/dl)	14 - 18	12 - 16	
PCV(hematokrit) (%)	42 - 52	37 - 47	
MCV (fl)	80 - 94	81 - 99	
MCH (pg)			27 - 31
MCHC (g/dl)			30 - 35
Hb A (%)			96 - 98
Hb F (%)			0.5 - 0.8
Hb A <sub>2</sub> (%)			1.5 - 3.2

Hematolojik bulguların normal değerleri Tablo 6' da belirtilmiştir. Bu testlerin dışında, hemoglobin elektroforezi ile hastanın kanındaki hemoglobin türleri (HbA, HbA<sub>2</sub>, HbF ve anormal hemoglobinler) ve miktarlarının belirlenmesi de teşhis için önemli bilgiler verir (79,80).

#### **2.4.2. DNA analiz yöntemleri**

Talasemiye ortaya çıkaran mutasyonun tipinin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem, DNA analizidir. Bu yöntemde, hastadan alınan örnekten DNA izole edilir, daha sonra da PCR amplifikasyonu, RFLP (restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi), southern blot, gen haritalama ve DNA sekans analizi yöntemlerinin uygun olanları kullanılarak mutasyonun genin hangi bölgesinde ve nasıl bir değişikliğe neden olduğu saptanır (79).

DNA analiz yöntemleri kullanılarak bütün mutasyonların belirlenmesi mümkündür; ancak bu mutasyonların sonucunda  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinin sentez oranlarının nasıl bir değiştiğini belirlemek için protein ve mRNA düzeyindeki analizlerin yapılması gerekir. mRNA analizi içinde pek çok bakımdan en avantajlı yöntem, RT-PCR yöntemidir. Bu yöntem, uygulaması kolay, maliyeti düşük ve radyoaktif madde kullanmadan, tehlikesiz bir şekilde, kısa sürede sonuca ulaştıran bir yöntemdir (79).

### **2.4.3. RT-PCR ile mRNA analizi**

Gen ifadesi ve düzenlenmesi, hücre ve doku işlevlerinin temeli olup transkripsiyon ve translasyon işlemlerine bağlıdır. Biyolojik informasyonunun, genomik dizilerden (çift iplikli DNA), nükleus içindeki heterojen nükleer RNA'nın sentezlenmesi, mRNA dizilerinin splayingi, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, translasyon ve translasyon sonrası modifikasyonlar yolu ile işlevsel bir polipeptide dönüşümü, moleküler biyoloji ve klinik tanıda geniş bir araştırma alanıdır (79).

Tipik bir memeli hücresi, yaklaşık  $5 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  RNA içerir. RNA'nın, gen ekspresyonunda çeşitli işlevleri olan beş değişik formu vardır. Hücresel RNA türlerinin hepsi, üç nükleer RNA polimerazdan birinin transkripsiyonel ürünüdür (79).

Gen ifadesi ölçülmesi çalışmalarında mRNA'nın amplifikasyonu amacına ulaşmak için, polimeraz zincir reaksiyonuna, bir ön basamak olarak ters transkripsiyon (revers transcription) reaksiyonunun eklenmesi ile DNA komplementeri (cDNA) sentezlenen mRNA molekülleri de PCR'da kalıp olarak kullanılabilir hale getirilebilmektedir. Bu ön reaksiyon, RNA bağımlı DNA polimerazlar olan revers transkriptaz enzimleri katalizörülüğünde gerçekleşmekte ve teknik, RT-PCR olarak adlandırılmaktadır (79).

PCR ile ilgili teknikler, vücut sıvılarındaki viral genom miktarının belirlenmesi ve özel bir mRNA'nın miktarının ve bu miktarın zamana göre veya indüksiyondan sonraki değişimlerinin saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır. PCR tekniğinin ilgi görmesinin sebeplerinden diğeri de, Northern blot gibi eski yöntemlere göre daha duyarlı olmasıdır. Bu duyarlılık sayesinde, son derece ender bulunan veya çok az sayıda hücre veya az miktardaki doku içinde var olan mRNA moleküllerinin saptama ve niceliklerinin belirlenmesi

mümkün olmaktadır. Northern blot tekniği için, her bir örnekten en az  $10^5$ - $10^6$  molekül gerekmektedir (81).

Hemoglobin genlerinin ifadelerinin, mRNA düzeyinde RT-PCR tekniği ile radyoaktivite kullanılmadan incelenmesi, beş basamakta gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklar sırası ile şöyledir:

1. Retikülositlerden RNA izolasyonu,
2. Revers transkripsiyon ile mRNA'ların cDNA'lara dönüştürülmesi,
3. Elde edilen cDNA'nın PCR amplifikasyonu,
4. Amplifikasyon ürünlerinin denatüre etmeyen (nondenatüre) poliakrilamid jelde elektroforezle ayrıştırılıp poliakrilamid jeldeki DNA örneklerinin gümüş nitrat ile boyanarak görünür hale getirilmesi,
5. Görüntülenen DNA bandlarının miktarlarının dansitometrik tarama ile belirlenmesi (79).

## **2.5. Talasemide Tedavi Yöntemleri**

### **2.5.1. Transfüzyon ve şelasyon tedavileri**

Beta talasemi majörlü olgularda yaşam için gerekli olan düzenli kan transfüzyonları zamanla vücutta demir birikimine neden olmaktadır. Aşırı demir yükü de başta kalp, karaciğer olmak üzere birçok organda toksik etkiler ile morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. Hipogonadizm %50, hipotiroidizm %10 ve hipoparatiroidizm %9 sıklık ile hala en yaygın görülen komplikasyonlardır. Diabet, kalp yetmezliği ve aritmiler de %6 civarında gözlenmektedir (82). Hepatit B ve C virüslerinin yol açtığı karaciğer hastalıkları bazı bölgelerde %70'lere kadar çıkmaktadır. Kronik hepatitlere ek olarak transfüzyona ikincil gelişen demir birikimi nedeniyle siroz ve hepatokarsinom riski artmaktadır (83). Bu nedenle etkili demir şelasyonu büyük önem taşımaktadır. Demir şelasyonu amacıyla ilk kullanılan ajan olan deferoksamin güçlü bir şelatör olmasına rağmen parenteral kullanımı ve yan etkileri nedeniyle hastalarda tedaviye uyum düşük oranlarda kalmıştır. Son yıllarda oral kullanılabilen şelatörlerin kullanıma girmesi ve organ demir yükünün non-invaziv metotlar ile belirlenebilmesi beta talasemi majörlü olguların prognozunun iyileşmesinde çok önemli bir rol oynamıştır (84).

### **2.5.2. Demir yükünün belirlenmesi ve izlem**

Demir şelasyonunun planlanması ve monitorizasyonu için vücut demir yükünün doğru olarak belirlenmesi gereklidir. Serum ferritin ölçümü en yaygın kullanılan, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Karaciğer hastalığı, enfeksiyon, neoplazi ve vitamin C eksikliği gibi ferritin sonucunu etkileyen etkenler bulunmadığında seri ölçümler şelasyon tedavisinin monitorizasyonuna yardımcı olabilir. Ancak serum ferritini karaciğer ve kalp dokusundaki demiri doğru olarak yansıtmaz. Vücutta demirin esas olarak karaciğerde depolanması nedeniyle karaciğer demir yükünün belirlenmesi çok önemlidir. Karaciğer demir yoğunluğu (LIC) karaciğer biyopsisi ile belirlenebilir. Fakat uygulama invaziv bir yöntemdir ve komplikasyon görülebilir. Bu nedenle rutin izlem yöntemi olarak kullanılamaz (84).

Talasemi majorlu hastalarda en sık ölüm nedeni kardiyak sorunlardır. Demir yüküne bağlı gelişen kardiyomyopati, konjestif kalp yetmezliği ve aritmiler nedeniyle kardiyak demir yükünün ölçümü büyük önem taşımaktadır. Dokulardaki demir yükünün belirlenmesinde 2000'li yılların başında MRI (Magnetic resonance imaging) kullanımı ile ilgili geliştirilen yöntem bu konudaki anlayışı tamamen değiştirmiştir. Anderson ve arkadaşları talasemi majorlu hastalarda kardiyak T2\* ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (85).

### **2.5.3. Oral demir şelatörleri**

Talasemi majorlu hastalarda ömür boyu düzenli transfüzyon yaşamsal önem taşımaktadır. Ancak oluşan demir birikimi de yaşamı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilmektedir. Aşırı demir serbest radikal oluşumu ile oksidatif stres yaratarak hücre ve organ hasarına neden olabilmektedir. Aşırı demir başlangıçta makrofajlara ve karaciğere daha sonra da endokrin organlar ve kalp dokusunda etkili olmakta tedavi edilmez ise hipogonadizm, hipotiroidizm, hipoparatiroidizm, diabet, karaciğer fibrozisi ve kalp yetmezliği nedeniyle erken ölümle sonuçlanabilmektedir (86).

İlk demir şelatörü olan deferoksamin (DFO) etkili bir ajan olmasına rağmen yüksek molekül ağırlığı ve yarı ömrünün kısa olması (20 dk.) ile parenteral uygulanma zorunluluğu kullanımını kısıtladığı gibi tedaviye uyumu da olumsuz etkilemiştir. Bu nedenle yıllarca,



ağızdan kullanılabilen ve etkili şelasyon yapabilecek ilaç geliştirilmesi konusunda yoğun çalışmalar yapılmıştır (84).

Deferipron (DFP) kuvvetli bir demir bağlayıcıdır. Oral alımı takiben hızla absorbe olur ve yaklaşık 1 saatte plazma seviyesi en üst düzeye ulaşır. Demir ile oluşturduğu kompleks büyük oranda idrar ile çok azı da dışkı ile atılır. Yarı ömrü 160 dk olması ve hızla aktif metabolitlerine glukronize olması nedeniyle günde 3 kez kullanılmalıdır. DFP kullanılan transfüzyona bağımlı hastalarda serum ferritin ve karaciğer demir konsantrasyonunda azalma sağlanabildiğini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. Buna ek olarak birçok çalışmada da kardiyak demirin uzaklaştırılması, kalp fonksiyonlarının düzeltilmesi ve kardiyak nedenli ölümlerin azaltılmasında DFO'ya göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar içinde en çarpıcı olanında T2\* değerleri 10-20 msn arasında olan 61 olgunun 12 aylık izleminde myokardiyal demir'deki azalma DFP alan grupta daha anlamlı bulunmuştur (87). Bu çalışmada sol ventrikül fonksiyonlarındaki düzelme de DFP grubunda daha belirgindi. Ayrıca DFP alan olgularda DFO grubuna oranla kardiyak olaylar ve kardiyak nedenli ölümlerin belirgin olarak daha az olduğunu gösteren çalışmalar da yayınlanmıştır (88,89). Kardiyak demirin uzaklaştırılmasında DFP'nin daha etkili olması düşük moleküler ağırlıkta olması, nötr yüklü olması ve lipofilik özelliği nedeniyle miyosit membranından geçişinin kolay olması ile açıklanmaktadır (90).

#### **2.5.4. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu**

Beta talasemi majorlu olgularda günümüzde tek kesin tedavi şansı hematopoetik kök hücre naklidir (HKHN). Miyeloablatif hazırlama tedavisi sonrası HLA uyumlu kardeş vericiden HKHN seçilecek tedavi olarak kabul edilmektedir (91,92).

HKHN uygulamalarında esas kısıtlayıcı faktör HLA uyumlu kardeş verici bulunamamasıdır. Beta talasemi majorlu olguların aile içi verici bulma şansı %25-30 civarındadır. Ailenin tek çocuğu olan hastalarda bu şans da yoktur. Son yıllarda bu olgular için alternatif donörlerden yapılan HKHN sonuçları ümit vericidir. Talasemi majorlu olgularda göbek kordon kanı da kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. HLA uygun akraba verici bulunamayan hastalarda alternatif donörlerden bir diğeri haploidentik vericilerdir. Haploidentik nakillerde en önemli sorunlar greft yetmezliği, immün rekonstitüsyonun gecikmesi, GVHD ve artmış fırsatçı enfeksiyon riskidir. Talasemili

olgularda haploidentik vericilerden yapılan nakiller konusunda deneyim kısıtlıdır. Son yıllarda tek gen hastalıklarında preimplantasyon genetik tanı ve HLA tipleme tekniklerindeki gelişmeler ailelere talasemili çocuklarına HLA uygun donör olabilecek sağlıklı bebek sahibi olma şansı vermektedir. Ancak etik, yasal ve finansal sorunlar olduğu gerekçesi ile bazı ülkelerde bu uygulamaya izin verilmemektedir. Türkiye’de ise kemik iliği naklinin hayati önem taşıdığı ve uygun kardeş verici bulunmadığı raporlanan olgularda sosyal güvenlik kurumu geri ödeme yapmaktadır. Ülkemizde başarı ile uygulanan bu yöntem ile birçok talasemili hasta HLA uyumlu verici kardeş ile HKHN şansına kavuşmuştur (93, 94).

### **2.5.5. Gen tedavisi**

Talasemi majorlu hastalarda klasik tedavi yöntemlerindeki gelişmeler yaşam kalitesini düzelttiği gibi yaşam süresini de artırmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen halen tek küratif tedavi yöntemi aile içi veya akraba dışı vericiden yapılan HKHN’dir. Ancak hastaların çok az bir kısmı HKHN şansına sahip olmakta ayrıca özellikle akraba dışı veya haploidentik vericiden yapılan nakillerde mortalite ve morbidite riski tedirginlik yaratmaktadır. Bu nedenle son yıllarda hematologlar, defektif  $\beta$ -globin genini düzeltmek amacıyla normal bir  $\beta$ -globin gen transferini ya da defektif geni bir homolog rekombinasyonla değiştirmeyi hedef alan alternatif stratejiler üzerinde çalışmaktadırlar. Her ne kadar insan globin genlerinin tanımlanması ve klonlanması sonrasında gen tedavisi teorik olarak mümkün hale gelse de iki önemli konu yıllarca engel teşkil etmiştir. Bu engellerden ilki, globin gen düzenlenmesinin son derece karmaşık olması diğeri ise hematopoetik kök hücrelere gen transferi için uygun vektör eksikliğidir. Retroviral vektörler ile yapılan ilk çalışmalar sonrasında  $\beta$ -hemoglobinopatilerde lentiviral vektörlerin daha uygun olduğunu gösteren, ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (95).

Hayvan modellerinde ve hücre düzeyinde alternatif tedavi yaklaşımları konusunda çalışmalar devam etmektedir. Son yıllarda Sox2, Oct3/4, Myc ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörlerinin transferi ile üretilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalar ümit verici görülmektedir. Ancak henüz güvenlik ve etkinlik yönünden yeterli kanıt bulunmamaktadır (96,97).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1.Kullanılan Malzemeler

##### Cihazlar

1. Coulter Counter	Coulter T-890
2. Thermal Gradient Cyler	Biometra
3. Microsantrifüj	Fisher235 B
4. Minigel elektroforez tankı	Pharmacia GNA-100
5. Mikrodalga fırın	Vestel Goldstar
6. UV lamba	Cole Parmer 9814
7. Otomatik pipet	Gilson (10, 20, 100, 200, 500 µl)
8. Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
9. pH metre	HANNA - HI 2211-02
10. Kuru banyo inkübatörü	Dry Bath
11. HPLC	Agilent

##### Kimyasallar

1. DNA İzolasyon kiti	Bioneer
2. Alfa talasemi mutasyon kiti	Bioneer
3. Hb A <sub>2</sub> Kiti	Bioneer
4. Agaroz	Sigma

#### 3.2. Örnek Toplama

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınarak Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmada Kahramanmaraş merkez ve ilçelerinden sağlıklı 100 kişinin her birinden 2 adet EDTA'lı tüpe yaklaşık olarak 5 ml. kan örneği alındı. Toplanan EDTA'lı kan örneklerinin 1 tüpü coulter cihazında kan sayımı ve HbA<sub>2</sub> ölçümü için kullanıldı. Diğer EDTA'lı tüpteki kan örneği ise DNA izolasyonu yapıldı.

### 3.3. Analizler

#### 3.3.1. Hematolojik İncelemeler

##### 3.3.1.1. Coulter sayımı

**Prinsip:** İletken sıvı ortamda iki elektrod ve aralarında daralıp genişleyebilen bir lobül sistem vardır. Tam kandaki şekilli elemanların oluşturduğu parçacıklar ortama süspanse halde verildiğinde büyüklük ve yoğunluklarına göre tübül sistemi daralıp genişlemektedir. Bu sırada sistemin potansiyel enerji farkı değişmekte ve ekranda çarpıntılar (pulse) oluşmaktadır. Çarpıntıların büyüklüğü ve sayısı, hücre sayısı ve büyüklüğü ile koşuttur. Sisteme giren parçacıklar bu şekilde değerlendirilmektedir.

EDTA'lı tüplere toplanan kan örnekleri birkaç defa yavaşça alt üst edilerek homojen hale getirildi. Sonra Coulter T-890 cihazında hematolojik ölçütler belirlendi. Eritrosit ve lökosit sayıları, hemoglobini (Hb), hematokrit (Hct), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobini konsantrasyonu saptandı.

##### 3.3.1.2. HbA<sub>2</sub> ölçümü

**Prinsip:** Hemolizat DE-52 reçinesi ile hazırlanmış kolona uygulanarak Hb A<sub>2</sub>, özgün pH ve klorid iyon konsantrasyonu altında diğer hemoglobinlerden ayrıştırılır. Her fraksiyonun absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans değerleri daha sonra Hb A<sub>2</sub> yüzdesini hesaplama da kullanılır.

**Ayırıklar:**

**Örnek Hazırlama:** 50 µL tam kan 200 µL distile veya deiyonize suyla seyreltilir.

**Kolon hazırlama:**

1. Kolon dengelendikten sonra 10 µL hemolizat kolona uygulanır ve 200 µL Hb A<sub>2</sub> elüsyonu ile yıkanır.

2. Hemolizat kolona tamamen absorbe edildikten sonra kolon 4 ml Hb A<sub>2</sub> elüsyonu ile yıkanır.
3. Kolon ikinci elüsyon ile yıkanır. Bu fraksiyon 16 ml suyla seyreltilip 415 nm dalga boyundaki absorbansı okunur.
4. Aşağıdaki formül kullanılarak Hb A<sub>2</sub> yüzdesi hesaplanır:

$$\% \text{ HbA}_2 = 100A/(A+(5N))$$

A: Hb A<sub>2</sub> fraksiyonunun absorbansı

N: Diğer hemoglobinler fraksiyonunun absorbansı

### **Normal Değerler:**

Sınırları: %1.5- 3.0 Hb

Ortalama: %2.4 Hb

### **3.3.2. Moleküler Çalışmalar**

#### **3.3.2.1. Tam kandan DNA İzolasyonu**

**Prensip:** BioneerAccuPrep Genomic DNA Extraction kiti kullanılarak saflaştırılmış DNA toplanır.

#### **Yöntem:**

- 1) EDTA.K<sub>3</sub> tüpüne alınmış olan tam kandan 200 µL ependorf tüpüne pipetlenir.
- 2) Üzerine 20 µL Proteinaz K, 200 µL bağlama tamponu eklenir ve vortekslenir.
- 3) 60 °C 'de 10 dakika inkübe edilir.
- 4) 100 µL izopropanol eklenir.
- 5) Elde edilen lizat bağlama tamponu tüpüne dikkatlice boşaltılır.
- 6) 1 dk. 8000 rpm de santrifüjlenir.
- 7) Bağlama tamponu tüpü yeni bir tüpe aktarılır.
- 8) Üzerine 500 µL yıkama tamponu 1 ilave edilir ve 1 dk 8000 rpm de santrifüjlenir.
- 9) Altta kalan sıvı dökülür ve 500 µL yıkama tamponu 2 ilave edilir.
- 10) 12000 rpm de 1 dk. santrifüj edilir.
- 11) Santrifüj sonrası bağlama tamponu başka bir ependorf tüpüne alınır.

12) Üzerine 200 µL elüsyon tamponu ilave edilir ve 1 dk. oda sıcaklığında bekletilir.

13) 8000 rpm de 1 dk santrifüjlenir.

Bu işlemlerden sonra DNA elde edilmiş olur ve +4 °C de muhafaza edilir.

### 3.3.2.2. Hedef DNA'nın Çoğaltılması ve İşaretlenmesi

Önce DNA'nın tanımlanmış hedef bölgesinin PCR yardımıyla çoğaltılması gerekir. Duyarlılığı en üst düzeye getirmek ve hedef dizilerin okunabilirliğini arttırmak için yeterli miktarda hedef DNA'nın çoğaltılması gerekir. Bunun için hedef DNA elektroforez ve işaretleme yapılmadan önce PCR ile çoğaltılır.

#### **Hedef DNA'nın Çoğaltılması**

##### **Alfa Talasemi PCR Protokolü**

PCR mix	17 µL
Primer mix	2 µL
Genomik DNA	1 µL
Taq polimeraz	0.1 µL

Tablo 7'de verilen primerler 100 pmol/µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu primerlerin her birinden 5 µL bir tüpe alınarak üzerine 50 µL su eklenerek primer mix (5pmol/ µL) hazırlanmıştır.

#### **α-globin gen zincirleri**

**Tablo 7:** α globin gen amplifikasyonunda kullanılan primerler ve delesyon türleri

Primer kodu	Primer dizisi 5'→3'	Delesyon türü (kb)/PCR ürün boyu (bp)
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	3.7 kb delesyon
3.7-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	2022 bp
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	<b>Normal</b>
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	1800 bp
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	4.2 kb delesyon
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	1628 bp
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	20.5 kb delesyon
20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	1007 bp
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	17.4 kb delesyon MED
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	807 bp

## Alfa talasemi PCR Programı

Denatürasyon	97°C	45 saniye
Primer bağlanması	60°C	1 dak 15 saniye
Zincir uzaması	72°C	2 dak 30 saniye

PCR tüpleri 95°C de 5 dakika inkübe edildikten sonra toplam 30 döngüden oluşan program başlatılmıştır. Son döngüye 72°C 5 dakika daha ek süre verilir. Bu işlem esnasında 0.5xTBE (pH:8) tamponu ile %1'lik agaroz jel hazırlanır. PCR ürünlerinden 9 µL alınarak 1 µL yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklenir. Sabit voltaj (100 Volt) uygulanarak 40 dakikada elektroforez işlemi tamamlanır. Etidyum bromür ile boyanan agaroz jel UV transiliminatör ile görüntülenerek resimleri çekilir.

### 3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

#### Ayırıcılar

#### **%1'lik Agaroz Jel**

Agaroz 1 g

100 mL 0,5 X TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözülerek hazırlanmıştır.

#### **Yükleme Tamponu**

Brom fenol mavisi %0,05

Gliserol %10

Ficoll %15

#### **5 X TBE Tamponu pH 8,0**

Tris baz 54,0 g

Borik asit 27,5 g

EDTA (0,5 M pH 8,0) 20 ml

1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

#### **Etidyum Bromür Çözeltisi**

EtBr 5 µg/ml olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

## **Yöntem**

Amplifiye olan üründen 20 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra %1,5'lik agaroz jele uygulanıp 100 voltta 40 dk. yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dk. boyanıp boyanın fazlası saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. DNA parçaları UV ile görünür hale getirilerek fotoğrafı çekilmiştir verim kontrol edilmiştir.





#### 4. BULGULAR

Daha önce alfa talasemi tanısı konulmayan ve metabolik rahatsızlığı bulunmayan, doğum yerleri Kahramanmaraş ve ilçeleri olan sağlıklı 100 kişiden kan örneği toplandı. Toplanan örneklerin hematolojik verileri incelendi. Örneklerin hemoglobin elektroforezi, Hb A<sub>2</sub> düzeyleri saptandı ve talasemili olguları ayırmak için plazma ferritin düzeyi ölçüldü. Tüm kan örneklerinin DNA'sı izole edilerek polimeraz zincir reaksiyonu ile alfa globin gen delesyonları incelendi.

Hematolojik bulgular değerlendirildiğinde, tüm örneklerin hemoglobin miktarı 7,8-16,9 g/dl, Hct oranı %21,8-49,5, MCV değerleri 53,9- 96,7 fl, MCH 17,2- 36,9 pg, MCHC oranı %30,4- 40,9 olarak bulunmuştur.

Tablo 8'de örneklerin hematolojik değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 8:** Hematolojik değerler

Kahramanmaraş Merkez Örneklere											
No	Olgu	Cinsiyet-Yaş	RBC (10 <sup>12</sup> /L)	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	HbA2 (%)	Hb F %	Hb Ele.
1	K.G.	K-18	5,0	<b>10,1</b>	32,9	<b>66,2</b>	20,4	30,7	1,9	0,0	AA
2	H.D.	K-21	4,6	<b>12,0</b>	38,4	82,9	26,0	31,3	2,0	0,0	AA
3	K.K.	K-21	4,9	<b>10,3</b>	34,8	<b>70,8</b>	21,0	29,7	1,7	2,5	AA
4	F.A.	K-22	4,9	14,1	43,9	89,9	28,9	32,1	2,2	0,8	AA
5	M.B.	K-24	4,7	14,4	41,5	87,7	30,5	34,7	2,2	0,2	AA
6	E.G.	K-24	5,0	14,0	40,4	80,9	28,0	34,6	2,2	0,0	AA
7	S.B.	K-26	5,0	13,0	38,4	<b>76,4</b>	25,9	33,9	1,9	0,0	AA
8	G.A.	K-27	4,4	13,0	37,9	87,1	30,1	34,5	2,5	0,2	AA
9	G.A.	K-27	4,7	12,8	38,4	82,3	27,5	33,4	2,3	0,0	AA
10	Y.Ç.	K-30	4,5	<b>7,8</b>	21,8	<b>48,2</b>	17,2	35,7	1,8	0,0	AA
11	H.G.	K-30	4,7	13,1	39,7	85,1	28,0	32,9	1,2	0,5	AA
12	E.U.	K-31	4,1	12,5	37,9	92,7	30,5	32,9	2,2	1,4	AA
13	Z.N.	K-31	4,4	<b>11,6</b>	34,2	<b>78,0</b>	26,5	33,9	2,2	0,0	AA
14	S.Ç.	K-32	4,6	13,1	38,1	83,4	28,6	34,3	2,1	0,0	AA
15	G.Y.	K-34	4,7	13,8	41,8	89,0	29,4	33,0	2,1	0,0	AA
16	S.A.	K-35	<b>3,6</b>	<b>10,3</b>	29,9	83,5	28,7	34,4	2,2	1,5	AA
17	A.F.	K-40	4,6	<b>9,7</b>	27,7	<b>60,1</b>	21,1	35,1	1,9	0,0	AA
18	Y.A.	K-42	5,2	<b>11,4</b>	36,2	<b>69,3</b>	21,8	31,4	3,1	0,2	AA
19	A.Ö.	K-42	4,3	13,3	39,1	91,1	31,0	34,0	1,9	1,0	AA
20	A.G.	K-42	5,2	14,3	42,5	84,6	27,1	35,8	2,0	0,0	AA
21	E.K.	K-43	4,3	<b>10,9</b>	30,9	<b>72,8</b>	25,7	35,3	1,9	0,0	AA
22	F.B.	K-43	5,2	14,1	38,0	<b>73,8</b>	27,4	37,2	2,4	0,0	AA
23	A.P.	K-45	4,6	<b>12,0</b>	34,9	<b>75,6</b>	26,1	34,5	1,4	0,0	AA
24	A.T.Ş.	K-47	4,5	12,7	36,5	80,9	28,2	34,9	2,2	0,0	AA

25	Y.D.	K-52	4,4	13,7	42,9	96,7	30,9	32,0	1,9	0,2	AA
26	C.E.	K-54	4,8	13,5	39,6	81,8	27,9	34,2	2,1	0,0	AA
27	A.T.	K-55	4,5	<b>12,0</b>	38,8	86,3	26,7	30,9	1,9	0,0	AA
28	I.G.	K-58	5,1	14,2	41,7	80,7	27,5	34,1	2,0	0,0	AA
29	N.K.	K-59	5,2	13,3	39,2	<b>75,0</b>	25,5	34,1	2,2	0,0	AA
30	Z.E.	K-60	4,1	<b>11,4</b>	33,4	81,7	27,9	34,2	2,2	0,0	AA
31	E.Ş.	K-61	4,9	13,8	40,8	83,9	28,4	33,9	2,2	0,0	AA
32	N.A.	K-62	4,6	13,9	42,4	92,5	30,4	32,9	1,9	0,5	AA
33	R.G.	K-64	4,6	13,4	39,6	86,8	29,3	33,7	2,1	0,0	AA
34	A.F.	K-67	4,6	13,7	40,8	89,1	29,9	33,6	2,1	0,0	AA
35	H.Ç.	K-71	4,5	<b>9,1</b>	27,0	<b>60,6</b>	20,4	33,7	1,9	0,9	AA
36	A.E.	K-72	5,2	15,0	46,3	89,8	29,2	32,5	3,5	0,2	AA
37	H.T.	K-72	4,6	12,9	38,2	<b>28,1</b>	28,1	33,6	2,0	0,0	AA
38	A.P.	K-76	5,3	15,4	46,3	87,7	29,1	33,2	2,2	0,0	AA
39	M.B.	E-13	4,5	13,0	39,3	86,5	28,0	33,0	2,1	0,0	AA
40	E.A.	E-20	5,7	15,3	47,3	83,4	27,0	32,4	2,2	0,0	AA
41	B.A.	E-21	5,6	16,6	48,3	86,1	29,6	34,4	2,3	0,0	AA
42	T.D.	E-22	6,0	16,7	51,0	85,3	27,9	32,8	2,5	0,0	AA
43	A.B.	E-23	5,2	15,5	46,9	90,7	30,0	33,0	1,9	0,0	AA
44	A.D.	E-23	5,1	14,8	44,1	88,3	29,5	33,5	2,3	0,0	AA
45	E.T.	E-27	5,5	16,0	49,0	89,4	29,2	32,7	2,5	0,0	AA
46	E.G.	E-29	5,0	14,8	43,7	87,0	29,4	33,8	2,3	0,0	AA
47	M.D.	E-30	5,6	16,0	48,5	87,5	28,8	32,9	2,3	0,0	AA
48	Ö.B.	E-30	5,4	15,7	47,2	87,9	29,2	33,3	2,3	0,0	AA
49	S.T.	E-31	4,6	12,8	37,7	81,3	27,6	33,9	2,2	0,0	AA
50	Ö.K.	E-44	5,1	13,4	41,9	<b>72,3</b>	24,2	33,4	2,2	0,0	AA
51	A.A.	E-45	4,9	13,7	42,2	86,8	28,1	32,4	2,4	0,0	AA
52	İ.T.	E-46	5,4	15,1	44,6	83,1	28,2	33,9	2,0	0,0	AA

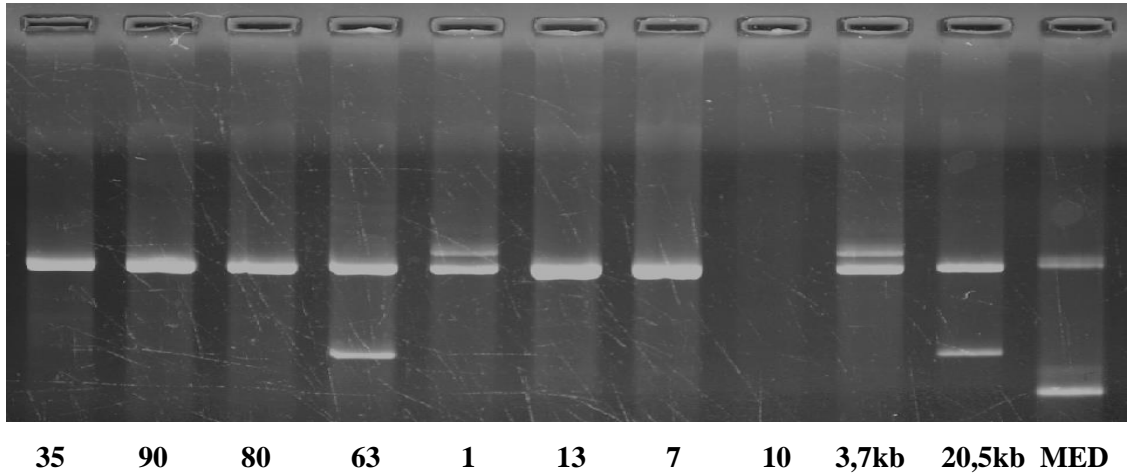
53	M.G.	E-47	4,6	13,0	40,8	89,8	28,6	31,9	2,1	0,0	AA
54	M.K.	E-58	5,2	15,7	46,2	88,4	30,1	34,1	2,3	0,7	AA
55	M.T.	E-59	5,0	14,8	44,0	88,5	29,9	33,7	2,1	0,0	AA
56	M.O.	E-68	4,8	13,4	40,9	84,5	27,8	32,9	2,5	0,0	AA
57	H.O.	E-70	4,8	12,6	38,7	80,4	26,2	32,5	1,8	0,2	AA
58	M.T.	E-76	4,8	14,6	42,9	89,8	30,6	34,1	2,5	0,0	AA
59	M.E.	E-77	5,4	<b>11,1</b>	31,9	<b>59,6</b>	20,8	34,8	2,0	0,3	AA
60	M.A.	E-78	5,0	14,4	44,4	89,4	28,9	32,3	1,8	0,3	AA
61	H.D.	E-83	4,9	14,7	43,4	88,2	29,8	33,8	2,1	0,1	AA
Elbistan Örnekleri											
62	B.Ş.	K-23	4,7	14,1	41,5	87,8	29,9	34,1	2,7	0,1	AA
63	Z.Y.	K-33	4,1	<b>9,0</b>	29,1	<b>71,8</b>	22,2	31,0	2,1	0,0	AA
64	R.A.	K-42	<b>3,5</b>	<b>10,2</b>	30,0	86,4	29,2	33,9	2,1	1,2	AA
65	Z.S.	K-43	5,0	13,9	44,2	87,6	27,6	31,5	2,3	0,0	AA
66	N.M.	K-52	4,2	12,9	37,4	89,2	30,9	34,6	2,5	0,0	AA
Afşin Örnekleri											
67	K.T.	K-19	4,1	13,6	42,2	<b>73,6</b>	23,7	32,2	1,7	0,3	AA
68	M.Ş.	K-21	<b>3,9</b>	<b>11,3</b>	32,8	84,3	29,0	34,4	2,3	0,0	AA
69	A.G.	K-39	4,3	13,2	41,7	<b>78,5</b>	26,7	31,7	2,1	0,1	AA
70	F.I.	K-39	4,5	14,2	42,5	95,1	31,8	33,4	2,6	0,0	AA
71	D.D.	K-65	<b>4,0</b>	12,6	36,7	91,6	31,5	34,4	2,1	0,8	AA
Andırın Örnekleri											
72	Y.G.	K-20	4,4	13,7	39,1	89,0	31,2	35,1	2,0	0,8	AA
73	E.C.	K-33	5,4	<b>10,6</b>	29,2	<b>53,9</b>	19,5	36,2	3,7	0,2	AA
74	H.D.	K-37	5,2	<b>11,8</b>	37,2	83,7	32,7	34,7	2,2	1,2	AA
75	F.D.	K-38	4,8	12,8	40,6	85,4	26,9	31,5	2,3	0,0	AA
76	H.D.	K-49	4,8	13,8	41,1	85,9	28,9	33,6	2,0	0,0	AA
77	H.B.	K-60	4,2	<b>11,7</b>	35,6	84,9	27,9	32,8	2,4	0,0	AA

Göksun Örnekleri											
78	H.K.	K-24	4,1	13,1	38,6	95,0	32,2	33,9	2,1	2,0	AA
79	F.D.	K-31	5,3	<b>11,9</b>	35,6	<b>67,6</b>	22,6	33,4	4,7	0,8	AA
80	P.Ç.	K-33	4,7	<b>11,9</b>	35,6	<b>76,3</b>	25,6	33,6	2,2	0,0	AA
81	N.A.	K-39	4,6	<b>12,1</b>	35,2	<b>77,3</b>	26,5	34,3	2,1	0,0	AA
82	D.G.	K-41	4,4	<b>10,4</b>	30,0	<b>68,7</b>	23,7	34,5	2,0	0,8	AA
83	A.K.	K-53	4,3	<b>12,2</b>	36,6	85,5	28,5	33,3	1,8	0,0	AA
84	G.S.	K-54	<b>3,8</b>	<b>11,2</b>	35,4	87,2	30,6	36,2	2,3	1,2	AA
85	Ü.K.	K-56	4,6	12,7	39,4	85,4	27,5	32,2	2,0	0,0	AA
86	Ü.A.	E-24	5,6	16,9	49,5	88,7	30,2	34,1	2,0	0,0	AA
Pazarcık Örnekleri											
87	S.A.	K-40	4,6	<b>10,4</b>	34,3	<b>74,7</b>	22,7	30,4	2,1	0,0	AA
88	S.D.	K-62	<b>3,2</b>	<b>11,9</b>	29,2	90,4	36,9	40,9	1,9	0,0	AA
89	İ.S.	E-28	4,2	13,5	45,1	82,0	26,2	32,7	2,4	0,0	AA
90	Ş.T.	E-50	5,2	13,1	33,5	<b>78,9</b>	21,9	34,7	2,0	0,0	AA
91	M.Ü.	E-57	5,0	14,5	41,8	83,8	29,2	34,8	1,8	0,3	AA
Türkoğlu Örnekleri											
92	S.K.	K-23	4,5	13,8	40,0	88,4	30,5	34,5	2,2	0,0	AA
93	A.K.	K-41	4,8	14,3	44,7	92,3	29,6	32,1	2,1	1,2	AA
94	H.T.	K-56	5,5	13,4	39,9	<b>73,3</b>	24,6	33,6	2,1	0,0	AA
95	O.D.	E-28	5,4	15,7	46,3	86,3	29,4	34,0	2,4	0,0	AA
96	Ö.Ç.	E-33	5,5	16,3	48,6	89,1	30,0	33,6	2,5	0,0	AA
97	F.B.	E-36	5,3	15,5	45,5	85,3	29,1	34,2	2,3	0,0	AA
98	M.B.	E-44	5,5	16,1	47,3	86,8	29,6	34,1	2,3	0,0	AA
99	M.Ç.	E-49	5,2	14,9	44,2	84,7	28,5	33,6	2,1	0,0	AA
100	A.H.	E-50	5,0	15,5	42,7	86,1	31,3	36,4	2,1	0,0	AA

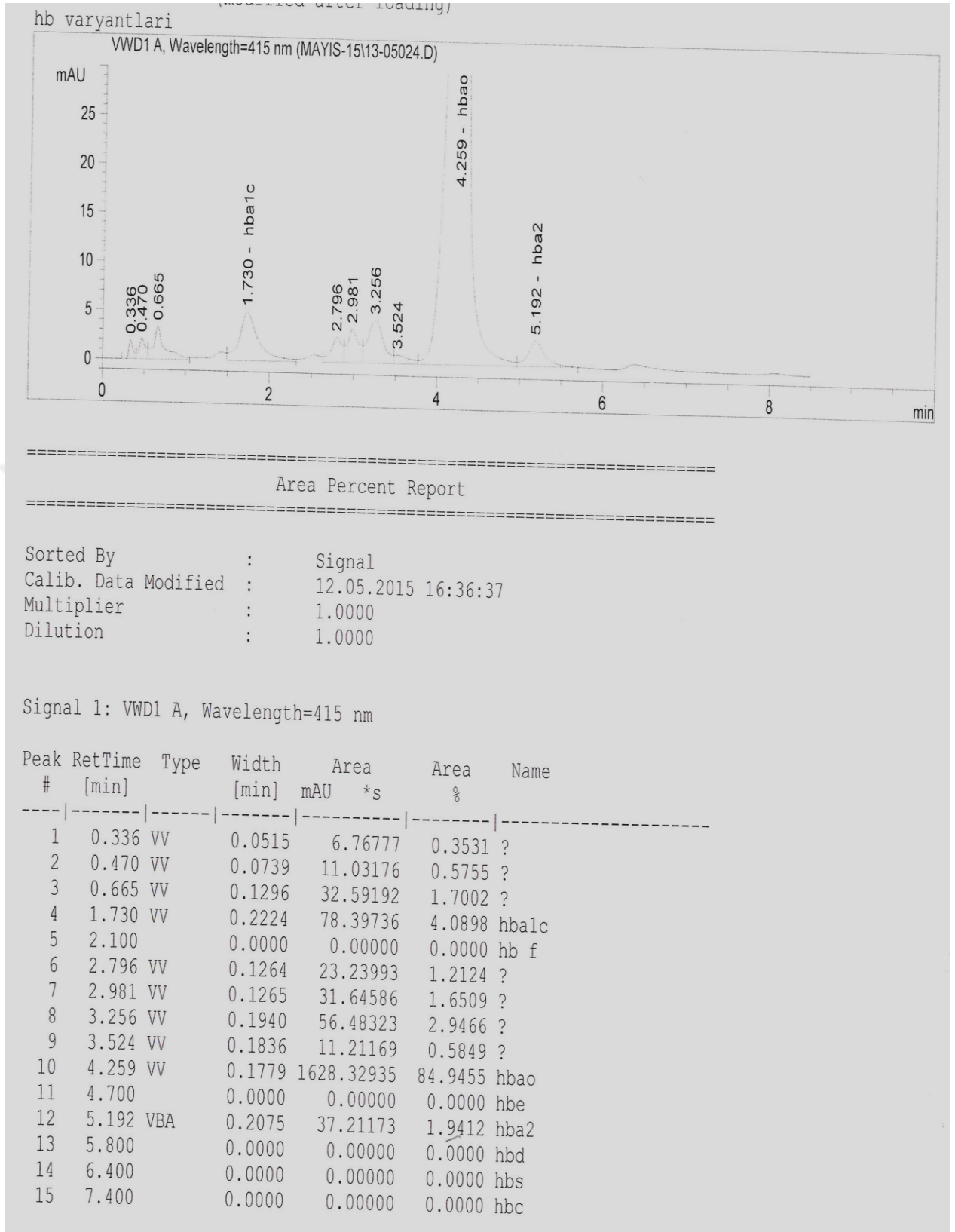
Hematolojik değerlere göre dokuz kişide (1, 3, 10, 17, 21, 35, 63, 82, 87) anemi tespit edilmiş (Tablo 9) olup HbA<sub>2</sub> değeri düşük olması nedeni ile alfa talasemi gen delesyonları araştırılmıştır. Bu tarama sonunda bir kişi 20.5 kb, diğer bir kişi de 3.7 kb heterozigot olarak tespit edilmiştir. Resim 1’de gösterilen 7, 13, 35, 80, 90 no’lu örnekler de gen delesyonu görülmezken, 1 numaralı örnek 3.7 kb ve 63 ise 20.5 kb gen delesyonu bulunmuştur.

**Tablo 9:** Anemi tespit edilen örneklerin hematolojik ve HbA<sub>2</sub> değerleri

No	Olgu	C-Y	RBC (10 <sup>12</sup> /L)	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	HbA <sub>2</sub> (%)	Hb F %	Hb Ele.
1	K.G.	K-18	5,0	<b>10,1</b>	32,9	<b>66,2</b>	<b>20,4</b>	30,7	<b>1,9</b>	0,0	AA
3	K.K.	K-21	4,9	<b>10,3</b>	34,8	<b>70,8</b>	<b>21,0</b>	29,7	<b>1,7</b>	2,5	AA
10	Y.Ç.	K-30	4,5	<b>7,8</b>	21,8	<b>48,2</b>	<b>17,2</b>	35,7	<b>1,8</b>	0,0	AA
17	A.F.	K-40	4,6	<b>9,7</b>	27,7	<b>60,1</b>	<b>21,1</b>	35,1	<b>1,9</b>	0,0	AA
21	E.K.	K-43	4,3	<b>10,9</b>	30,9	<b>72,8</b>	<b>25,7</b>	35,3	<b>1,9</b>	0,0	AA
35	H.Ç.	K-71	4,5	<b>9,1</b>	27,0	<b>60,6</b>	<b>20,4</b>	33,7	<b>1,9</b>	0,9	AA
63	Z.Y.	K- 33	4,1	<b>9,0</b>	29,1	<b>71,8</b>	<b>22,2</b>	31,0	<b>2,1</b>	0,0	AA
82	D.G.	K-41	4,4	<b>10,4</b>	30,0	<b>68,7</b>	<b>23,7</b>	34,5	<b>2,0</b>	0,8	AA
87	S.A.	K-40	4,6	<b>10,4</b>	34,3	<b>74,7</b>	<b>22,7</b>	30,4	<b>2,1</b>	0,0	AA

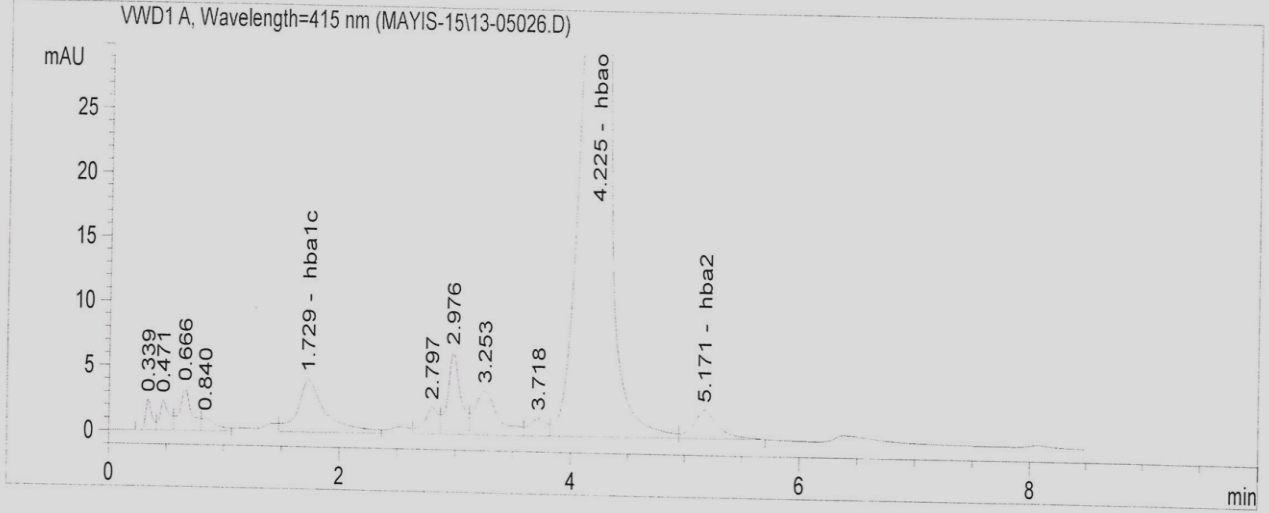


**Resim 1:** PCR temelinde  $\alpha^{-3.7}$ ,  $\alpha^{-20.5}$  ve MED mutasyonları için agaroz jel görüntüsü



Şekil 17: 3,7 kb'lık delesyon belirlenen 1 no'lu örneğin HPLC görüntüsü

hb varyantlari



=====  
Area Percent Report  
=====

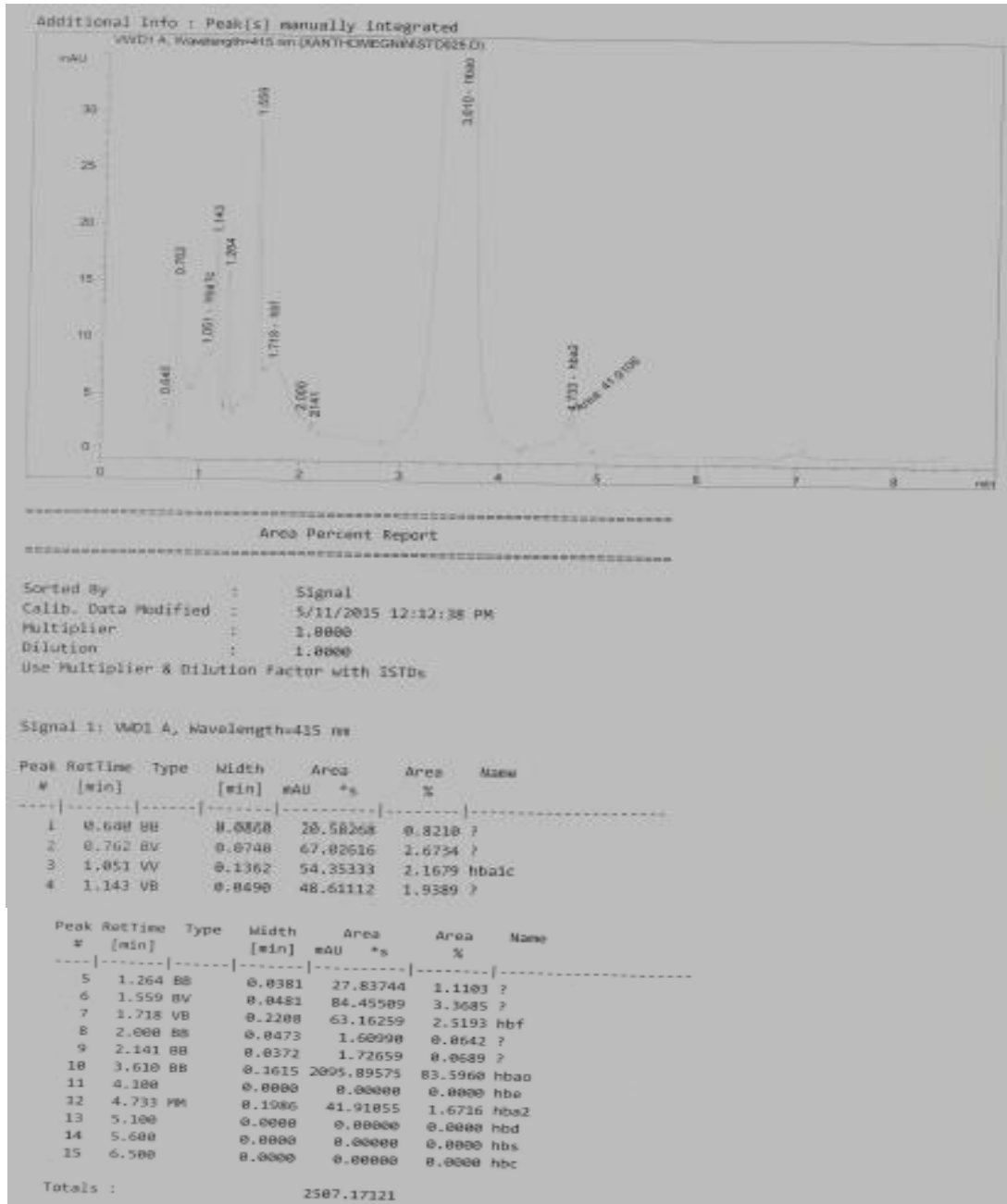
Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 12.05.2015 16:36:37  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=415 nm

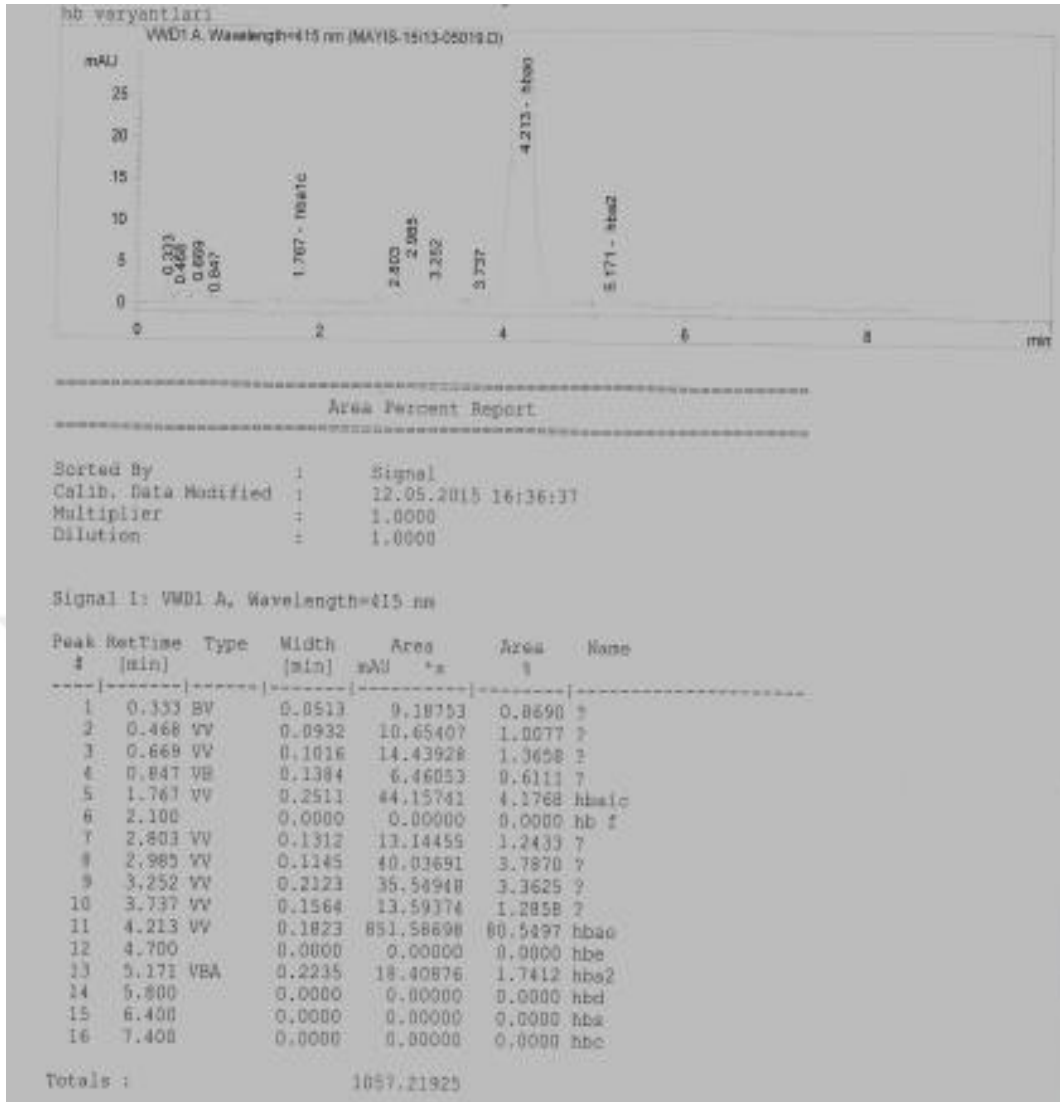
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Name
1	0.339	PV	0.0557	8.80816	0.5717	?
2	0.471	VV	0.0757	12.53274	0.8135	?
3	0.666	VV	0.1028	23.86172	1.5488	?
4	0.840	VV	0.1316	8.56669	0.5561	?
5	1.729	VV	0.2361	68.38179	4.4386	hba1c
6	2.100		0.0000	0.00000	0.0000	hb f
7	2.797	VV	0.1165	17.42936	1.1313	?
8	2.976	VV	0.1102	49.39608	3.2062	?
9	3.253	VV	0.2082	48.68152	3.1598	?
10	3.718	VV	0.1486	14.24562	0.9247	?
11	4.225	VV	0.1789	1256.18152	81.5367	hba0
12	4.700		0.0000	0.00000	0.0000	hbe
13	5.171	VBA	0.2120	32.54813	2.1126	hba2
14	5.800		0.0000	0.00000	0.0000	hbd
15	6.400		0.0000	0.00000	0.0000	hbs
16	7.400		0.0000	0.00000	0.0000	hbc

Şekil 18: 20.5 kb'lık delesyon belirlenen 63 no'lu örneğin HPLC görüntüsü

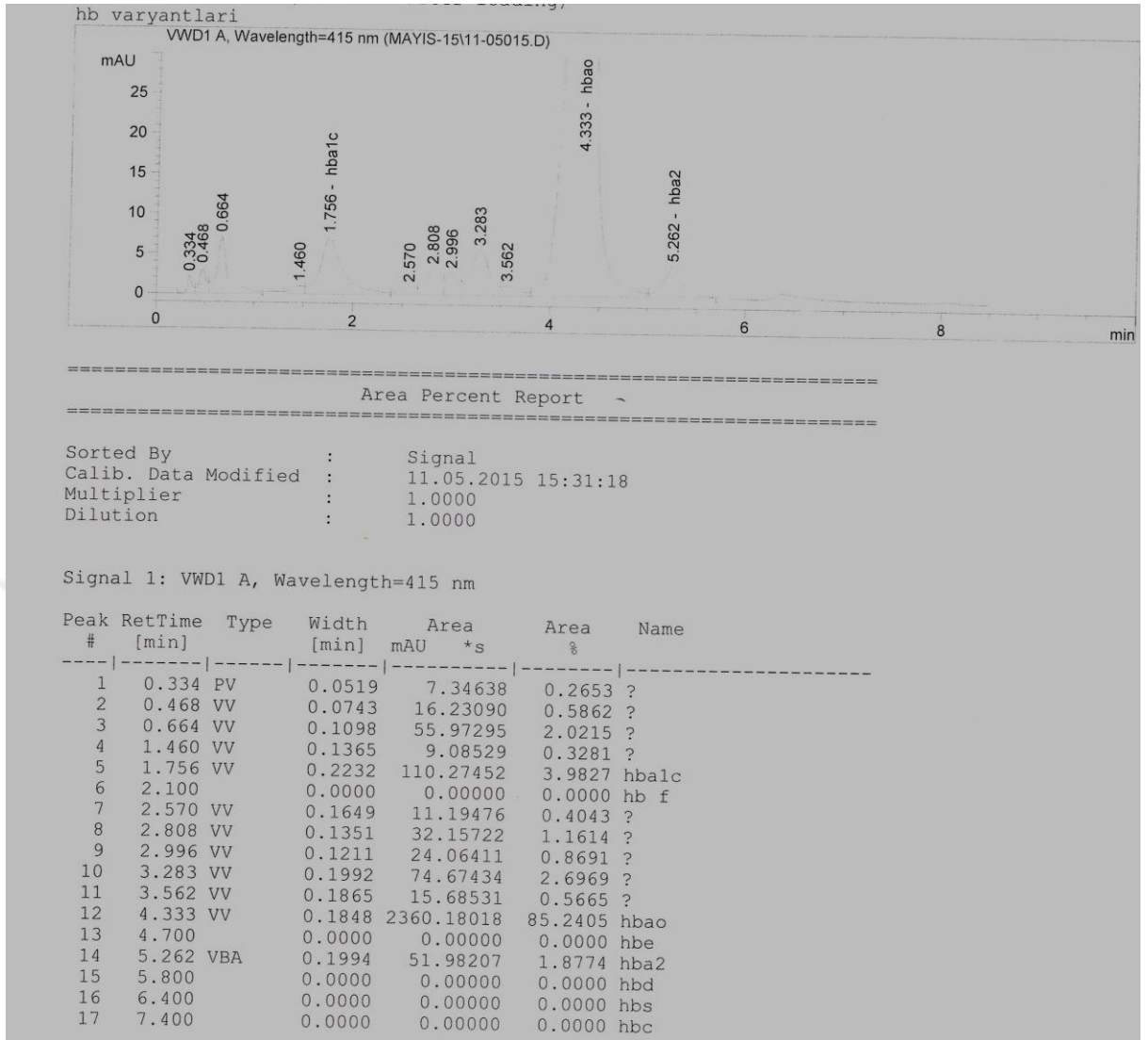




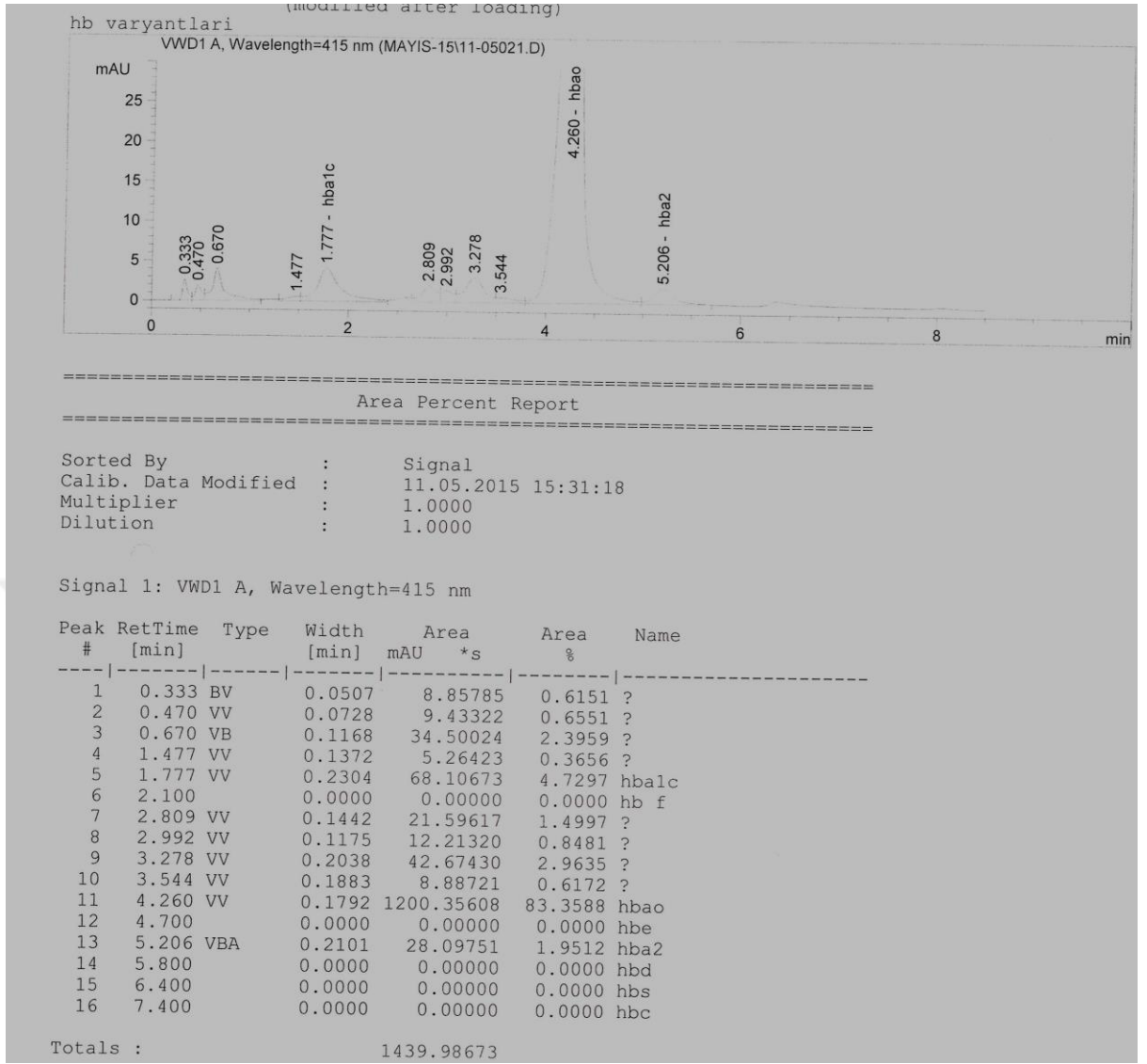
Şekil 19: Anemi tespit edilen 3 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



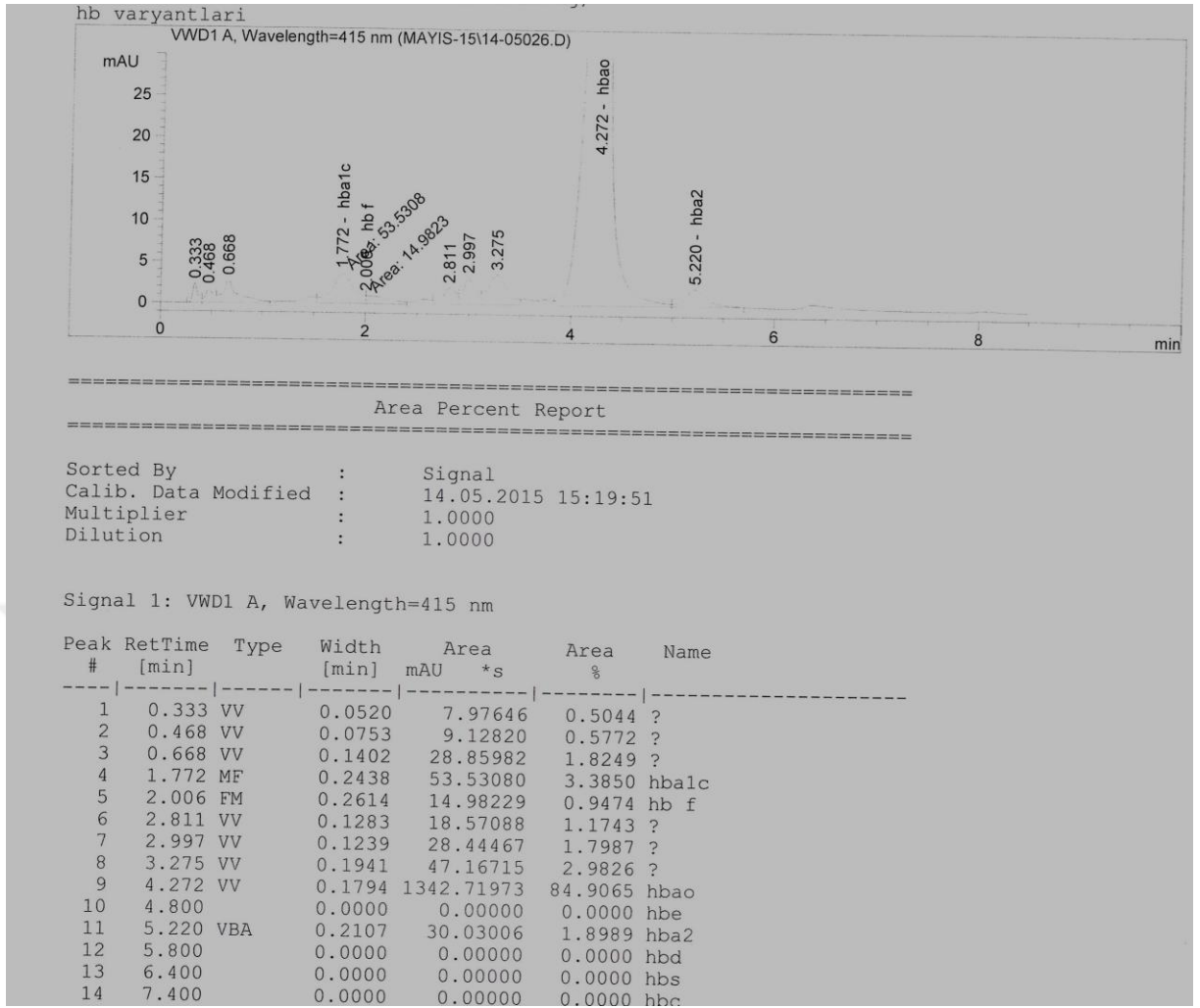
Şekil 20: Anemi tespit edilen 10 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



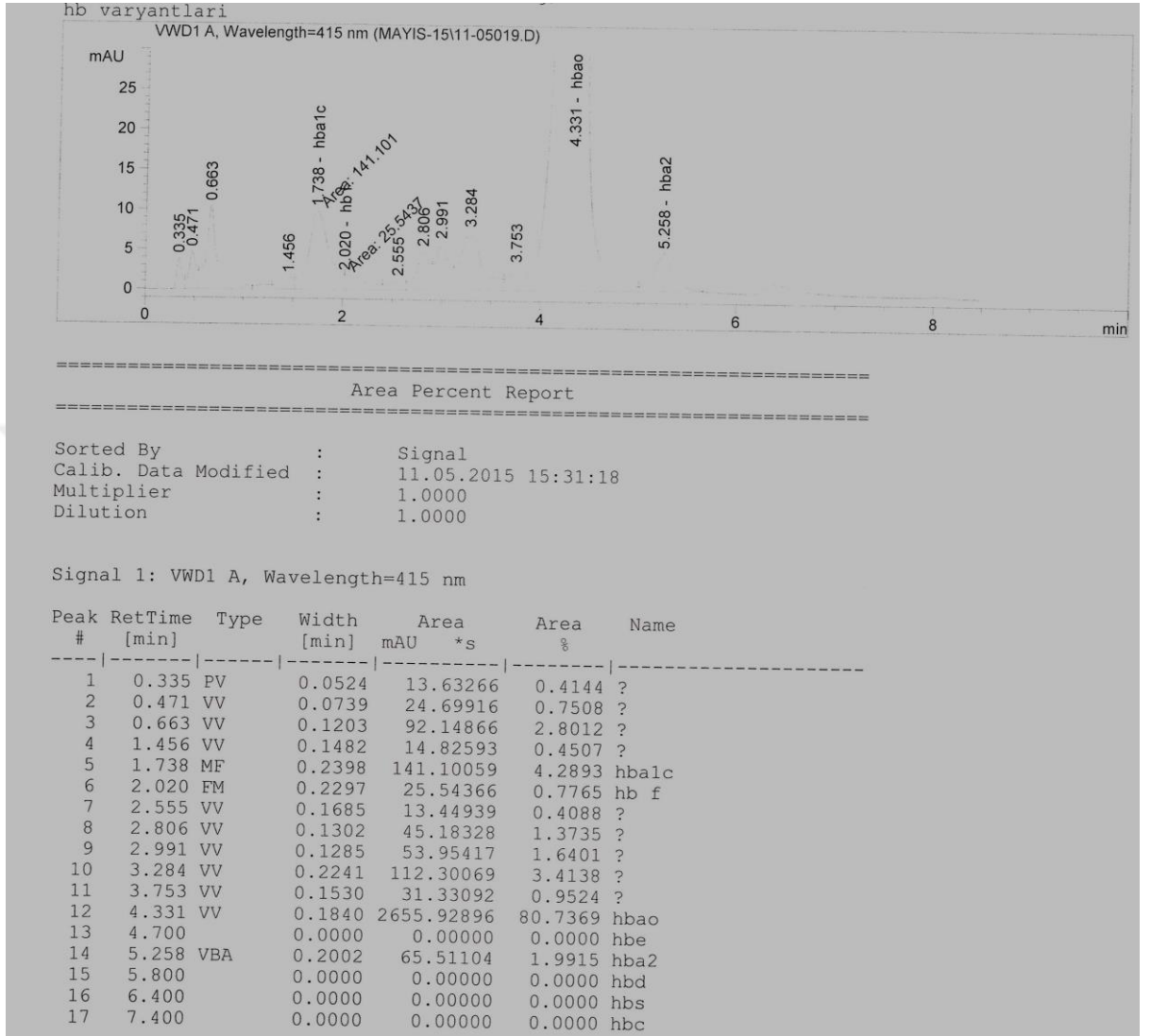
Şekil 21: Anemi tespit edilen 17 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



Şekil 22: Anemi tespit edilen 21 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



Şekil 23: Anemi tespit edilen 35 no'lu örneğin HPLC görüntüsü

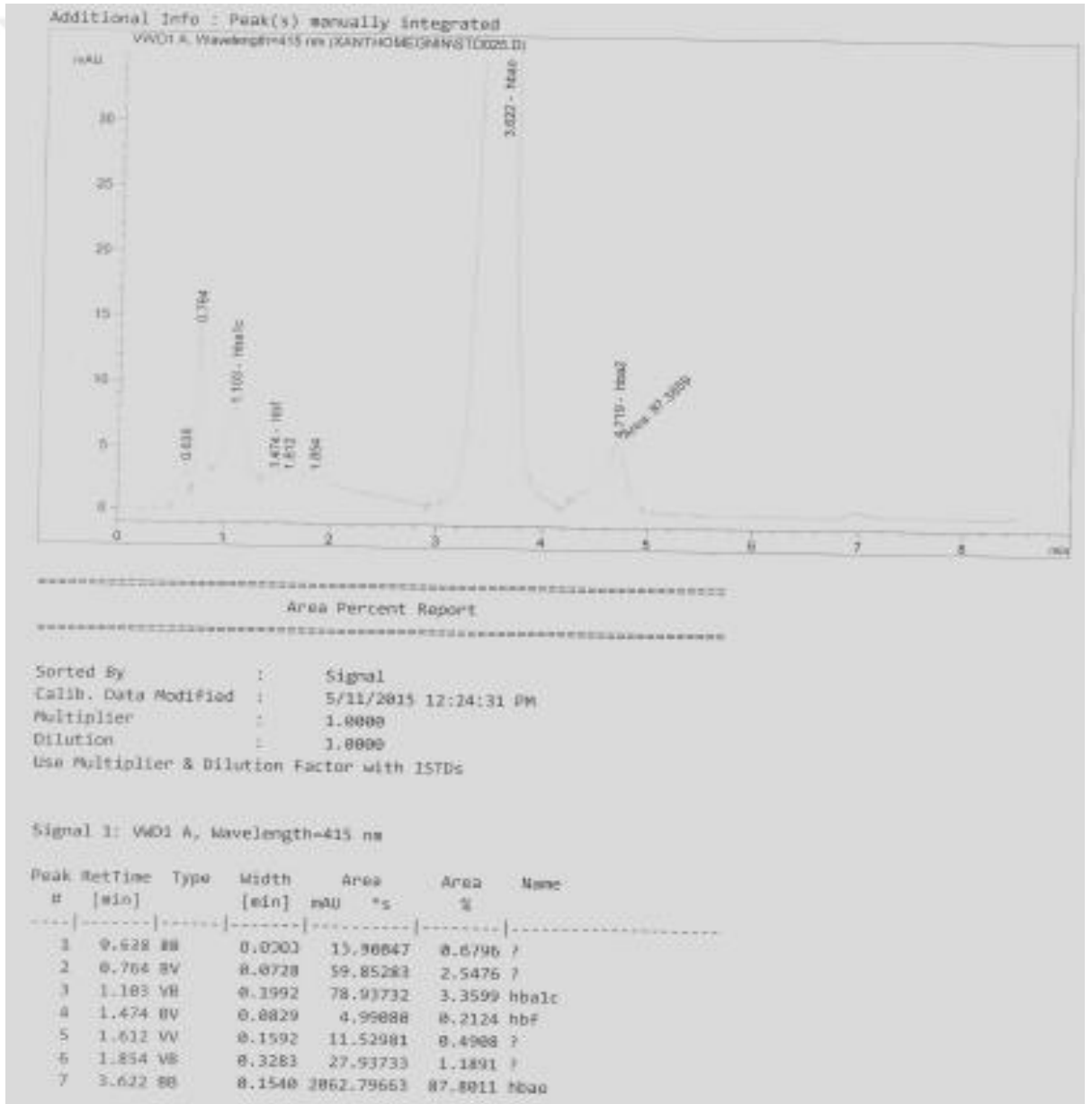


Şekil 24: Anemi tespit edilen 82 no'lu örneğin HPLC görüntüsü

Bu çalışmada iki örneğin (73 ve 79) HbA<sub>2</sub> değeri % 3.7 üzerinde bulunmuş olup β talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (Tablo 10).

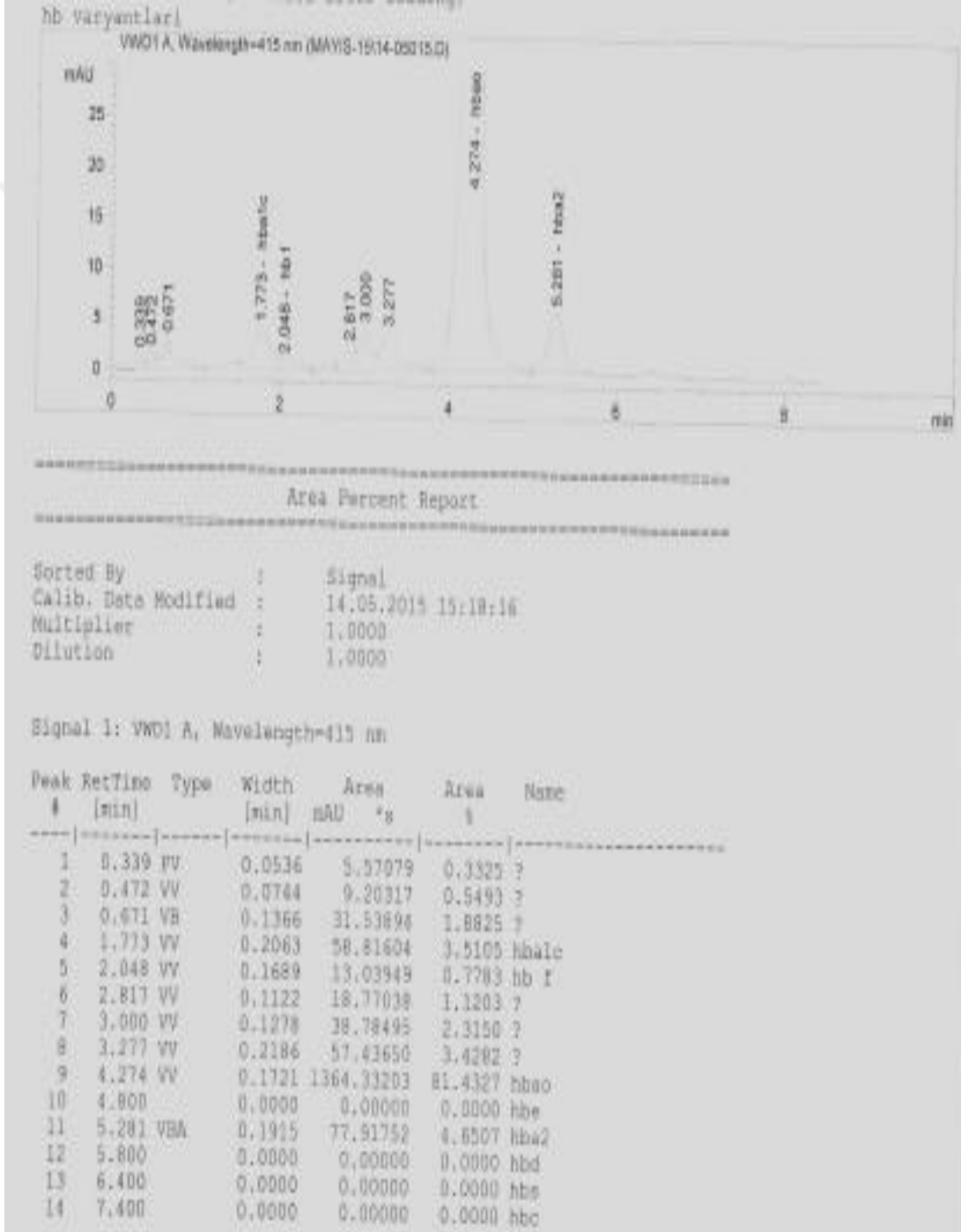
**Tablo 10:** β talasemi taşıyıcısı olduğu belirtilen örneklerin hematolojik değerleri

No	Olgu	Cinsiyet-Yaş	RBC (10 <sup>12</sup> /L)	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	HbA <sub>2</sub> (%)	Hb F (%)	Hb Ele.
73	E.C.	K-33	5,4	<b>10,6</b>	29,2	<b>53,9</b>	19,5	36,2	<b>3,7</b>	0,2	AA
79	F.D.	K-31	5,3	<b>11,9</b>	35,6	<b>67,6</b>	22,6	33,4	<b>4,7</b>	0,8	AA



8	4.100	0.0000	0.00000	0.0000	hbe
9	4.719	0.2771	87.38586	3.7195	hba2
10	5.100	0.0000	0.00000	0.0000	hbd
11	5.600	0.0000	0.00000	0.0000	hbs
12	6.500	0.0000	0.00000	0.0000	hbc
Totals :			2349.39785		

Şekil 25:  $\beta$  talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenen 73 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



Şekil 26 :  $\beta$  talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenen 79 no'lu örneğin HPLC görüntüsü



## 5.TARTIŞMA

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalardan ilki olan hemoglobinopatiler, dünyada en yaygın olarak gözlenen genetik hastalık grubudur. Hemoglobinopati taşıyıcı sıklığı Dünya Sağlık Örgütü tarafından %5.1 olarak bildirilmiş ve her yıl yaklaşık olarak 365.000 hasta çocuk dünyaya gelmektedir. Hastalık yoğun olarak Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmesinin yanı sıra göçlerle birlikte Avrupa, Amerika ve Avustralya toplumuna da yayılmış ve Türkiye'nin özellikle güney ve batı bölgesinde sıklıkla görülmektedir (23).

Hemoglobinopatilerde globin zincirlerindeki yapısal değişimler ve sentez yetersizliği işlevsel değişikliğe neden olduğu için hastalık olarak karşılaşılmaktadır. Bu değişimler anormal hemoglobin ve talasemi olarak iki ana sınıfta incelenir (98).

Hemoglobinopatilerden özellikle Hb S,  $\alpha$ -talasemi ve  $\beta$ -talaseminin sıklıkla görülmesinin nedenlerinden birisi de Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülen sıtmaya karşı koruyucu olmalarıdır (99). Bu bölgelerde hemoglobinopatilerin varlığıyla sıtmadan kaynaklı ölümlerin azaldığı görülmüştür (68). Bir genetik varyant, enfeksiyon hastalıklarına karşı koruma sağlıyorsa enfeksiyon hızını bozacak ve epidemiyi kıracaktır (11). Sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde klasik bir örnek olan Hb S'in frekansının yüksek olması bu hipotezi desteklemektedir. Sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde  $\alpha$ -talaseminin de arttığı bilinmektedir (98).

Hb S ve  $\alpha$ -talaseminin sıtmaya karşı bir koruyucu olduğunun bilinmesine rağmen bu konunun mekanizması hakkındaki bilgiler yetersizdir. Hb S'li örnekler için durum biraz daha aydınlatıcıdır. Eritrositleri enfekte eden *P. Falciparum* parazitleri oraklaşan hücrelerde uygun yaşam koşullarını sağlayamaz. Ancak  $\alpha$ -talaseminin nasıl bir mekanizma ile sıtmaya karşı korumada görev aldığına dair yeterli bilgi bulunmamaktadır (68).

Subtropik iklim kuşağında bulunan ülkemizde  $\alpha$ -talasemi taşıyıcılığı %2 iken; Çukurova bölgesinde bu oran %3,3'dür.  $\alpha$ -talasemilerin tanısını koymak zordur, çünkü hematolojik veriler normal bireyden farklı olmayabilir (11).

$\alpha$ -talasemi çalışmalarında örnek seçimi öncelikle demir eksikliği anemisi ekarte edilmiş olguların Hb, MCV ve Hb A<sub>2</sub> düzeyleri değerlendirilerek yapılır. Alfa talasemi mutasyonları sıklıkla delesyonel mutasyonlardan kaynaklıdır. Daha az olarak delesyonel

olmayan mutasyonlar sonucunda görülür. Nondelesyonel mutasyonların sıklığı delesyonel mutasyonların sıklığının üçte biri kadardır (23). Türkiye’de delesyonel mutasyonlardan en sık görüleni 3,7 kb iken bunu takiben 4,2 kb, 20,5 kb, MED I (17,4 kb) ve MED II (26,5 kb) mutasyonları görülmektedir (51).

Öner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yirmi beş Hb H hastasında, on farklı genotip saptanmış ve en sık görülen  $\alpha$ -talasemi mutasyon tipinin 3,7 kb delesyon olduğu bildirilmiştir (66).

Canatan ve arkadaşları Antalya’da Hb H hastalarının moleküler temelinde  $\alpha^{3,7}$ ,  $\alpha^{4,2}$ , MED-I ve  $\alpha^{20,5}$  mutasyon tiplerinin olduğunu göstermişler ve Antalya’da  $\alpha$  talasemi taşıyıcı sıklığının düşük olduğunu bildirmişlerdir (101).

Yüreğir ve arkadaşları, Adana’nın Karataş bölgesinde  $\alpha^{3,7}$  mutasyonlu ve  $\alpha$ -gen triplikasyonlu olgular olduğunu bildirmişlerdir (52). Yüreğir ve arkadaşları  $\alpha$ -tal-1 ve  $\alpha$ -tal-2 mutasyonunun yanında  $\alpha_2$  globin geninin poliadenilasyon kuyruğunda nokta mutasyonu (AATAAA→AATGAA) olduğunu göstermişlerdir (65).

Çürük ve arkadaşları iki Türk hastada unstabil  $\alpha$  globin varyantı olan Hb Adana ile kombine alfa tal-1 olgularının varlığını göstermişlerdir (33). Çürük ve arkadaşları Çukurova’da beş değişik  $\alpha$  gen delesyonu ve dört nondelesyonel mutasyon tipi tanımlamışlardır (102).

Polat uzmanlık tezinde, Mersin yöresinde yaptığı çalışmada sekiz olguda  $\alpha^{3,7}$  ve bir olguda  $\alpha^{20,5}$  delesyon tipinin varlığını göstermiştir (11).

Yalın doktora tez çalışmasında,  $\alpha$  talasemiye neden olan mutasyon tiplerinden  $\alpha^{3,7}$ ’nin %45, MED I’in %28,3,  $\alpha^{20,5}$ ’nin %1,7 sıklıkta gözlemlendiğini ve  $\alpha^{4,2}$  mutasyonuna rastlamadığını bildirmiştir (22).

Çürük ve arkadaşları Çukurova’da Hb H hastalığı olan, otuz iki olgunun altısında – – MED I(-17,4)/- $\alpha^{3,7}$ , iki olguda – – MED II(-26,5) / $\alpha^{5\text{ nt}}$   $\alpha$ , bir olguda – – MED I(-17,4) /- $\alpha^{3,7}$  + Hb AS, bir olguda – – MED I(-17,4)/ $\alpha^{5\text{ nt}}$   $\alpha$ , dokuz olguda – – $^{20,5}$ /- $\alpha^{3,7}$ , bir olguda – – MED I(-17,4) / $\alpha^{\text{PA1}}$   $\alpha$ , bir olguda – – $^{20,5}$ /- $\alpha^{4,2}$ , iki olguda – – $^{20,5}$ / $\alpha^{\text{codon59}}$ , üç olguda – – MED II(-26,5)/- $\alpha^{3,7}$ , dört olguda – –

MED II (-26,5)/ $\alpha^{PA2}$ , bir olguda  $\alpha^{PA1}$ / $\alpha^{PA1}$  ve bir olguda -- MED II (-26,5) /  $\alpha^{PA2}$  + Hb AS varlığını göstermişlerdir (61).

Arıyürek doktora tez çalışmasında Konya yöresinde yapmış olduğu çalışmada 164 olgunun 84'ünde  $\beta$  talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, birinde  $\alpha^{3,7}$  talasemi mutasyonu taşıyıcılığı ve birinde Hb S mutasyonu taşıyıcılığı belirlenmiştir. Mutasyon taraması yapılan olgulardan 3 tanesi IVS I-110/ IVS I-110 homozigot mutant, 3 tanesi IVS II-745/ IVS I-110 ve 1 tanesi D/ IVS I-110 çifte heterozigot olarak belirlenmiştir.  $\beta$  talasemi taşıyıcılığı belirlenen olguların %74'ü IVS I-110, %9'u Cd 8, %5'i Cd 39, % 4'ü Cd 5, %4'ü IVS I-1, %2'si IVS II-745, %1'i Cd 44 ve -87 mutasyonu taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (4).

Attila ve arkadaşları çalışmalarında Çukurova'da Hb S oranını %10,  $\beta$  talasemi oranını %3,7 ve  $\alpha$  talasemi oranını %3,3 olarak bildirmektedir. Doğum öncesi tanı yapılan 249 fetustan 49 tanesini homozigot ya da çifte heterozigot hasta olarak belirlemişlerdir. Bunların %13,7'sinde Hb S, %5,6'sında  $\beta$  talasemi, %0,4'ünde  $\alpha$  talasemi ve %0,4'ünde Hb S+ $\beta$  talasemi mutasyonu tespit etmişlerdir (103).

Tadmouri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Türkiye'de en yaygın görülen  $\beta$  talasemi mutasyonunun IVS I-110 olduğunu ve bunu IVS I-6, Cd 8, IVS I-1, IVS II-745, IVS II-1, Cd 39, -30 ve Cd 5 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir. IVS I-110 mutasyonunun bölgelere göre dağılımının Marmara Bölgesi için %34,1, Ege ve Akdeniz Bölgesi için %42,4, İç Anadolu için %52,3, Güneybatı Anadolu için %26,4, Karadeniz Bölgesi için %31,0 ve Batı Anadolu için %27,1 olarak değiştiğini rapor etmişlerdir (50). Bir başka çalışmalarında ise yaygın olarak görülen mutasyonlardan 7 tanesinin Türk popülasyonunda görülen mutasyonların %72'sini oluşturduğunu ve bunların sırasıyla %41 IVS I-110, %13 IVS I-6, %8 IVS II-1, %6 Cd8, %5 IVS I-1 ve %5 IVS II-745 mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir (104).

Altay çalışmasında 9'u kararlı, 4'ü kararsız, 1'i uzamış toplam 14  $\alpha$ , 19'u kararlı, 2'si kararsız, 3'ü talasemik, 1'i delesyon/insersiyon toplam 25  $\beta$ , 1  $\gamma$  globin zinciri mutasyonu ile oluşan ve 2 de hibrit hemoglobin olmak üzere toplam 42 anormal hemoglobin rapor etmiştir. Akar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bunlara ek olarak 2002 yılından sonra Türkiye'de 2  $\alpha$ , 4  $\beta$  ve 1  $\delta$  globin zinciri mutasyonu sonucu oluşan anormal hemoglobin tiplerini bildirmişlerdir (30,31).

Atalay ve arkadaşları Türkiye’de  $\beta$  talasemi mutasyon tiplerini ve bölgesel dağılımlarını inceledikleri çalışmalarında %36 IVS I-110, %22 IVS I-6, %13 IVS I-1, %7 Cd 39, %4 IVS II-745, %2 Cd 8 ve %1 IVS II-1 olarak bildirmişlerdir (105).

Topal ve arkadaşları IVS I-110 mutasyonu yüzdesini Antakya’da %64, Kayseri’de %68, İzmir’de %47 olduğunu Antakya bölgesinde %18 IVS I-1, %6 Cd39, %6 IVS I-6 ve %6 IVS II-1 olduğunu, Kayseri bölgesinde %20 Cd8, %5 IVS I-6, %2 Cd5 ve IVS I-1 olduğunu ve İzmir bölgesinde %7 IVS I-1, %7 Cd5 ve Cd39 olduğunu bildirmişlerdir (106).

Evrensel ve arkadaşları Kayseri bölgesinde yaptıkları çalışmalarında en yüksek sıklıkla IVS I-110 mutasyonu olduğunu (%76), Cd5’in %8, IVS I-6’nın %8, Cd8’in %6 ve Cd39’un ise %3 olduğunu bildirmişlerdir (107).

İnce ve arkadaşları Güneydoğu bölgesinde en yaygın  $\beta$  talasemi mutasyonunun yine IVS I-110 olduğunu (%27,8) ve bunu %11,1 oranlarında IVS I-6 ve Cd 8, %8,3 oranında IVS II-1 ve %5,5 oranında IVS II-745 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir (108).

Ulutaş ve arkadaşları Kadirli bölgesinde evlilik öncesi tarama yaptıran 1994 kişiden 98’inde (%4,91) beta-talasemi taşıyıcılığı tespit etmişlerdir. HbD, beş taşıyıcılık (%0.46) ve bir hasta oranı (%0.09) ile en fazla görülen anormal hemoglobini tipi olduğunu, iki kişide HbS ve bir kişide HbE taşıyıcılık tespit ettiklerini bildirmişlerdir (109).

Canatan ve arkadaşları tarafından Kahramanmaraş’ın Elbistan ilçesinde yapılan tarama çalışması sonucu  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı sıklığını % 1 (n=995) olarak göstermişlerdir. Hemoglobin S tespit edilmemiş ve 3 HbD taşıyıcısı varlığını bildirmişlerdir (110).

Güler ve arkadaşları tarafından Mart 2006–Şubat 2007 tarihleri arasında Kahramanmaraş ilinde evlilik öncesi taranan 11040 kişinin (5520 erkek, 5520 kadın), 261’inde (130 erkek, 131 kadın)  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı, 59’unda (31 erkek, 28 kadın) HbS saptanmış ve taşıyıcılık oranları  $\beta$ -talasemi için %2.35 ve HbS için %0.54 bulmuşlardır. Beş çiftin her ikisinde de  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı saptanmıştır (111).

Akhava-Niaki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada İranın kuzey illerinden gelen 722 (376 erkek, 346 kadın)  $\alpha$ -talasemi taşıyıcısının dahil edildiği çalışma da 215 kişide nokta mutasyon (polyA1:14, polyA2:133, -5 nt:48, Hb Constant Spring: 32), 446 kişide delesyonel mutasyon ( $-\alpha^{3.7}$ : 367,  $-\alpha^{4.7}$ : 54, --Med: 62), 61 kişide iki mutasyon ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ : 50,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ : 6,  $-\alpha^{3.7}/\alpha^{PA2}$ : 7,  $-\alpha^{3.7}/\alpha^{CSP}$ : 5) olduğunu göstermişlerdir (112).

Bu çalışmada, Kahramanmaraş ve ilçelerinden toplanan 100 tam kan örneklerinde PCR yöntemi ile alfa talasemi gen delesyonları ve nokta mutasyonları araştırılmıştır. Dokuz kişide anemi tespit edilmiş olup HbA<sub>2</sub> değeri düşük olması nedeni ile alfa talasemi gen delesyonları araştırılmıştır. Araştırma sonucu bir kişide 3.7 kb'lık, bir diğer kişide 20.5 kb'lık delesyon saptanmıştır. İki örneğin HbA<sub>2</sub> değeri % 3.7 üzerinde bulunmuş olup beta talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda Kahramanmaraş ili %2'lik oran ile alfa talaseminin nadir görüldüğü bölgelerden biri olduğu gösterilmiştir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. 100 kişiden toplanan kan örneklerinde hematolojik değerleri ve HbA<sub>2</sub> değerleri incelenerek moleküler çalışma yapılacak örnekler belirlenmiştir.
2. HbA<sub>2</sub> değeri normalin altında olan örneklerde PCR yöntemi ile alfa talasemi mutasyon tipleri çalışılarak bir kişide 3,7 kb'lık, bir diğer kişide 20,5 kb'lık delesyon olduğu gösterilmiştir.
3. Kalıtsal kan hastalıklarının önlenmesinde taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı çalışmaları önemlidir. Bunun yanında hemoglobinopatilerde günümüzde radikal bir tedavi yapılamadığından farklı bölgelerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalı ve bu çalışmalarda mutasyonların hızlı, doğru ve güvenilir olarak belirlenmesi için yeni teknolojilerden faydalanılması gerekmektedir.
4. Bölgemizde ender görülen anormal hemoglobinlerin ve talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeydeki yapılarının aydınlatılması ile ilgili yapılacak çalışmalarda örnek sayısının artırılarak devam edilmesi gerektiğini ve çalışmamızda elde edilen verilerin daha geniş gruplarda anlamlı ve değerli sonuçlara ulaştıracağını düşünmekteyiz

## 7. KAYNAKLAR

1. Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for  $\beta$  thalassemia. JAMA 1997; 278(15): 1273-77.
2. Canatan D. Dünyada ve Türkiyede talasemi ve anormal hemoglobinler. Talasemi ve Hemoglobinopatiler. Antalya, 2007.
3. Rund D, Rachmilewitz E. Pathophysiology of  $\alpha$ - and  $\beta$ - thalassemia: Therapeutic implication. Sem Hematol 2001; 38(4): 343-349.
4. Arıyürek SY. Konya bölgesinin anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tiplerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 2009.
5. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th Edition, USA, 2001.
6. Seydel SG. Hemoglobinopatilerin mikroarray yöntemiyle belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2007.
7. Yüregir GT, Atilla G. Hemoglobinopatiler ve tanı yöntemleri. ÇÜ Tıp Fak Der 1997; 1-18.
8. Yüregir GT. Klinik Biyokimya. s.132-143, ÇÜ Tıp Fakültesi Yayınları, Adana, 1990.
9. Vergin C. Anormal Hemoglobinler. s. 47-54. 5. Uluslararası Talasemi Yaz okulu, Antalya, 20-24 Ekim 2008.
10. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Radwell VW. Harper's Biochemistry. 21th Edition, Long Medical Book, London, 1988.
11. Polat G. Alfa talasemili bir ailenin mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Adana, 1995.
12. Genç A. Hemoglobin varyantlarının DNA dizi analizi ile belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2005.

13. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-104.
14. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. *Disorders of Hemoglobin*. 2nd Edition, Cambridge University, UK, 2009.
15. Tang Y, Huang Y, Shen W, Liu G, Wang Z, Tang XB, ve ark. Cluster specific regulation pattern of upstream regulatory elements in human alpha- and beta-globin gene clusters. *Exp Cell Res* 2008; 314(1):115-22.
16. Tang Y, Wang Z, Huang Y, Liu DP, Liu G, Shen W, ve ark. Gene order in human  $\alpha$ -globin locus is required for their temporal specific expressions. *Genes to Cells* 2006;11:123–31.
17. Chan V. *Thalassemia: Molecular Defects in  $\alpha$ -Thalassemia*. IX Congress of Ish-Asian-Pacific Division, s. 100-103, Bangkok-Thailand, 24-28 Ekim 1999.
18. Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, Smith ZE, Ayyub H, Heinlein CA, ve ark.  $\alpha$ -thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood* 2000; 96(3):800-807.
19. Plant KE, Routledge SJE, Proudfoot NJ. Intergenic transcription in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Mol Cell Biol* 2001; 19 (21):6507-14.
20. Genç A, Zeren F, Çürük MA. Hemoglobinopatilerde sorunlu vakaların analizi. s. 25-27. 5. Uluslararası Talasemi Yazokulu, Antalya, 20-24 Ekim 2008.
21. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassaemia Syndromes*. 4th Edition, Blackwell Science, London, 2001.
22. Yalın E.  $\alpha$  talasemi ve G6PD enzim eksikliğine neden olan mutasyonların moleküler düzeyde incelenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 2004.
23. Dönbak L. İnsan Hemoglobin Varyantları. *KSÜ Fen ve Müh Der*, 2005; 8: 13–22.



24. Huisman THJ. The Hemoglobinopathies. Churchill Livingstone Com, Edinburgh, 1986.
25. Emery AEH, Muller RF. Elements of Medical Genetics. 8th Edition, Churchill Livingstone Com, London, 1992.
26. Sforza LLC, Menozzi P, Piazza A. The History and Geography of Human Genes. Princeton University, UK, 1994.
27. Bunn HF, Forget BG. Molecular Genetic and Clinical Aspects. 2nd Edition, WB Saunders Com, Philadelphia, 1986.
28. Huisman THJ. The Structure and function of normal and abnormal hemoglobins. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6:1-30.
29. Huisman THJ. Blood Disease of Infancy and Childhood, 7th Edition, Mosby-Year Book Inc, St Louis. 1995.
30. Altay Ç. Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Haematol* 2002; 19:63-74.
31. Akar E, Akar N. A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol* 2007; 24:143-145.
32. Tahiroğlu M. Hatay-Samandağ yöresindeki liselerde hemoglobinopati tiplendirilmesi ve bilgilendirilmesi çalışması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Adana, 2010.
33. Curuk MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, ve ark. Hb Adana or alpha 2 (59) (E8) Gly→Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the-(alpha) 20.5 Kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. *Am J Hematol* 1993; 44:270-75.
34. Bilginer A, Lehmann H, Arcasoy A. Hemoglobin Ube-2 (alpha 68 Asn→Asp) observed in a Turkish family. *Hemoglobin* 1984; 8:189-91.
35. Yalcin A, Avcu F, Beyan C, Gurgey A, Ural AU. A case of Hb J- Meerut (or Hb J Birmingham) [alpha 120 (H3) Ala→Glu]. *Hemoglobin* 1994; 18:433-5.

36. Aksoy M, Gurgey A, Altay C, Kılinc Y, Carstairs KC, Kutlar A, ve ark. Some notes about HbQ India and Hb Q Iran. Hemoglobin 1986;10: 215-9.
37. Ozdag H, Yildiz İ, Akar N. First observation of homozygote Hb Q Iran (alpha 75(EF 4) Asp→His. Turk Hematol 2008; 25:48-50.
38. Lukens JN. Wintrobe's Clinical Hematology. pp. 1405-1448 10th Edition, Mass Publising Co, Egypt, 1999.
39. Loukopoulus D. Thalassemia genotypes and phenotypes. Ann Haematol 1991; 62:145-150.
40. Başak AN. Talaseminin Moleküler Genetiği. s. 99-106. Temel Moleküler Hematoloji Kursu, Mersin, 12-13 Mart 2005.
41. Akar N, Cavdar AO, Dessi E, Loi A, Pirastu M, Cao A.  $\beta$ -Thalassemia mutations in the Turkish population. J Med Genet 1987; 24:378-79.
42. Çürük M. Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler. ÇÜ Basımevi, Adana, 2005.
43. Haigh H, Kazazian J. The Thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. Semin Hemat 1990; 27(3) :209-28.
44. Arcasoy A. Türkiye'de thalassemia taşıyıcı sıklığı ve anormal hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, 1994.
45. Çavdar AO. Türkiye'de talasemi insidansı. Thalassemia Sempozyumu, TÜBİTAK, Ankara, 1981.
46. Curuk MA, Arpacı A, Atilla G, Tuli A, Kılinc Y, Aksoy K, ve ark. Genetic heterogeneti of  $\beta$ -thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. Hemoglobin 2001; 25:241-245.
47. Curuk MA, Zeren F, Genc A, Aygun SO, Kılinc Y, Aksoy K. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia in Southern Turkey. Hemoglobin 2008; 32(6):525-530.
48. Yuregir GT, Arpaci A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Ozgunen T, ve ark. Population at risk for hemoglobinopathies in Cukurova Turkey: Need for prenatal diagnosis. Ann Med Sci 1995; 4(2):61- 9.

49. Basak AN, Ozcelik H, Ozer A, Tolun A, Aksoy M, Agaoglu L, ve ark. Molecular basis of the  $\beta$ -thalassemia in Turkey. *Hum Genet* 1992; 89:315-18.
50. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, ve ark. Molecular and population genetic analyses of  $\beta$ -thalassemia in Turkey. *Am J Hematol* 1998; 57:215-20.
51. Çürük MA, Genç A, Hüseyinova P, Zeren F, Aksoy K. Çukurova’da alfa talasemi genotipleri ve Hb H hastalığı. *Türk Klin J Pediatr Sci* 2007; 3(10):17-23.
52. Yüreğir GT, Aksoy K, Dikmen N. Alfa talasemi taramasında tek tüp osmotik frajilitenin yeri. *Doğa Tr J Med Sci* 1990; 14:374-380.
53. Polat G, Aksoy K. Alfa talasemilerin moleküler yapısı. *Arşiv* 1998; 7(4):349-66.
54. Liebhaber SA. Alpha thalassemia. *Hemoglobin* 1989; 13:685-731.
55. Sharpe JA, Summerhill RJ, Vyas P, Gourdan G, Higgs DR, Wood WG. Role of upstream DNAase I hypersensitive sites in the regulation of human alpha globin gene expression. *Blood* 1993; 82:1666-71.
56. Ren S, Luo XN, Atweh GF. The major regulatory elements upstream of the alpha – globin gene has classical and inducible enhancer activity. *Blood* 1993; 81:1058-66.
57. Hatton CS, Wilkie AO, Drysdale HC, Wood WG, Vickers MA, Sharpe J, ve ark. Alpha-thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha globin gene cluster. *Blood* 1990; 76:221-7.
58. Bernet A, Sabatier S, Picketts DJ, Ouazana R, Morle F, Higgs DR, ve ark. Targeted inactivation of the major positive regulatory elements (HS-40) of the human alpha-globin gene locus. *Blood* 1995; 86:1202-11.
59. Salah K, Baysal E.  $\alpha$ -Thalassemia in the United Arab Emirates. *Acta Haematol* 1998; 100:49-53.
60. Foglietta E, Giancarlo D, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* 1996; 81:387-96.

61. Curuk MA. Hb H (beta4) disease in Cukurova, Southern Turkey. *Hemoglobin*, 2007; 31:265-71.
62. Kan YW, Dozy AM, Trecartin R, Todd D. Identification of a nondeletion defect in alpha thalassemia. *N Eng J Med* 1977; 297:1081-4.
63. Curuk MA, Baysal EA, Gupta RB, Sharma S, Huisman TH. An IVS-I-117 (G→A) acceptor splice site mutation in the alpha-1 globin gene is a nondeletional alpha thalassemia-2 determinant in an Indian population. *Br J Haematol* 1993;85:148-52.
64. Chui DHK, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003; 103(3): 791-800.
65. Yuregir GT, Aksoy K, Curuk MA, Dikmen N, Fei YJ, Baysal E, ve ark. Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. *Br J Haematol* 1992; 80:527-32.
66. Oner C, Gurgey A, Oner R, Balkan H, Gumruk F, Baysal E, ve ark. The molecular basis of Hb H disease in Turkey. *Hemoglobin* 1997; 21:41-51.
67. Zago MA, Costa FF, Bottura C. Hemoglobin H disease in three Brazilian families. *Rev Brasil Genet* 1984;1:137-47.
68. Bernini LF.  $\alpha$ -Thalassaemia. *Baillière's Clin Haem* 1998; 11(1):53-90.
69. Williams TN, Mwangi T, Wambua S, Peto TEA, Weatherall DJ, Gupta S, ve ark. Negative epistasis between the malaria-protective effects of  $\alpha^+$ -thalassemia and sickle cell trait. *Nature* 2005; 37(11):1253-7.
70. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetic of the haemoglobinopathies. *Baillière's Clin Haem* 1998; 11:1-51.
71. (<http://science.jrank.org/pages/48501/Sickle-Cell-Anemia-Thalassemia.html>) Erişim Tarihi: 01.03.2016.
72. Aksoy M. Hemoglobinopathies in Turkey. *Hemoglobin* 1985; 9:209-16.
73. Aluoch JR, Kılınç Y, Aksoy M, Yuregir GT, Bakioglu I, Kutlar F, ve ark. Sickle cell anemia among Eti Turks: haematological clinical and genetic observations. *Br J Hematol* 1986; 64:45-55.

- 74.** Khatami S, Dehnabeh SR, Mostafavi E, Kamalzadeh N, Yaghmaei P, Saeedi P, ve ark. Evaluation and comparison of soluble transferrin receptor in thalassemia carriers and iron deficient patients, *Hemoglobin* 2013; 37(4): 387–95.
- 75.** Li H, Ginzburg YZ. Crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *Adv Hematol* 2010; 2010:605435.
- 76.** Uaprasert N, Rojnuckarin P, Bhokaisawan N. Elevated serum transferrin receptor levels in common types of thalassemia heterozygotes in Southeast Asia: a correlation with genotypes and red cell indices. *Clin Chim Acta* 2009; 403(1–2):110–3.
- 77.** Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol* 2011; 86(11):923–7.
- 78.** Iron: deficiency and toxicity. (<http://www.drhoffman.com/page.cfm/120>) Erişim tarihi: 01.03.2016.
- 79.** Sözen MM. mRNA analizi ile talasemiye neden olan mutasyonların alfa ve beta gen ekspresyonları üzerine etkilerinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, 2000.
- 80.** Hoffbrand AV, Petit JE, *Essential haematology*. Blackwell Science 1993; 2-12: 95-120.
- 81.** Köhler TH, Laßner A, Rost K, Thamm B, Pustowitz B, Remke H. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction nonradioactive PCR methods. Springer 1995.
- 82.** Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, ve ark. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 2004; 89:1187-93.
- 83.** Restivo Pantalone G, Renda D, Valenza F, D’Amato F, Vitrano A, Cassarà F, ve ark. Hepatocellular carcinoma in patients with thalassaemia syndromes: clinical characteristics and outcome in a long term single centre experience. *Br J Haematol* 2010; 150:245-7.

- 84.** Yeşilipek MA. Talasemide yeni tedavi yöntemleri. Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya ve İstanbul Göztepe Çocuk Kemik İliği Nakil Üniteleri, 2014;4-1; 214-21.
- 85.** Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, ve ark. Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001; 22:2171-9.
- 86.** Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in  $\beta$ -thalassemias. *Pediatric Rep* 2011; 3:65-78.
- 87.** Pennell DJ, Berdoukas V, Karagiorga M, Ladis V, Piga A, Aessopos A, ve ark. Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood* 2006; 107:3738-44.
- 88.** Piga A, Gaglioti C, Fogliacco E, Tricta F. Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. *Haematologica* 2003; 88:489-96.
- 89.** Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, ve ark. Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patients with thalassemia major. *Blood* 2006; 107:3733-7.
- 90.** Hider RC, Liu ZD. Emerging understanding of the advantage of small molecules such as hydroxypyridinones in the treatment of iron overload. *Curr Med Chem* 2003; 10:1051-64.
- 91.** Yesilipek MA, Ertem M, Cetin M, Oniz H, Kansoy S, Tanyeli A, ve ark. HLA-matched family hematopoietic stem cell transplantation in children with beta thalassemia major: the experience of the Turkish Pediatric Bone Marrow Transplantation Group. *Pediatr Transplant* 2012; 16:846-51.
- 92.** Isgro A, Gaziev J, Sodani P, Lucarelli G. Progress in hematopoietic stem cell transplantation as allogeneic cellular gene therapy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1202:149-54.

- 93.** Kuliev A, Rechitsky S, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y. Preimplantation genetics: Improving access to stem cell therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054:223-7.
- 94.** Yesilipek MA, Karasu G, Erçelen N, Uygun V, Akcan M, Kupesiz A, ve ark. Successful hematopoietic SCT from non-identical twins to two sisters with  $\beta$ -thalassemia major by using preimplantation genetic diagnosis and HLA typing. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1581-2.
- 95.** Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:276-83.
- 96.** Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, ve ark. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29:73-8.
- 97.** Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, Zhang J, Chen J, Yao C, ve ark. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res* 2012; 22:637-48.
- 98.** Adams JG, Coleman MB. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of thalassemia. *Semin Hemat* 1990; 27(3):229-38.
- 99.** Flint J, Harding RM, Clegg JB, Boyce AJ. Why are some genetic diseases common? *Hum Genet* 1993; 91:91-117.
- 100.** Çürük MA, Arpacı, Gülsev H. Nondelesyonel Alfa Talasemi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi. *Tübitak* 1997.
- 101.** Canatan D, Oğuz N, Güvendik I, Yildirim S. The incidence of alpha-thalassemia in Antalya. *Turk J Haematol* 2002; 19:433-4.
- 102.** Curuk MA, Kilinc Y, Evruke C, Ozgunen FT, Aksoy K, Yüreğir GT. Prenatal diagnosis of Hb H disease caused by a homozygosity for the alpha-2 poly A (AATAAA→AATAAG) mutation. *Hemoglobin* 2001; 25:255-8.
- 103.** Attila G, Çürük MA, Arpacı A, Özgünen FT, Kılınç Y, Aksoy K, ve ark. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in southern Turkey. *Ann Med Sci* 1999; 8(2): 93-7.

104. Tadmouri G, Başak N.  $\beta$  thalassemia in Turkey: A review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin* 2001; 25(2): 227-39.
105. Atalay EÖ, Çırakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytakin H, ve ark. Regional distributions of  $\alpha$ -thalassaemia mutations in Turkey. *Int J Hematol* 1993; 57: 207-11.
106. Topal K. Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde  $\alpha$ -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 1998.
107. Evrensel E, Yalın AE, Aksoy K. Kayseri Yöresinde  $\beta$ -Talasemi Mutasyon Dağılımı. Tanı da Moleküler Tıp Sempozyumu, 2003.
108. İnce HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Müftüoğlu E. Molecular basis of  $\beta$  thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin* 2003; 27(4): 275-8.
109. Ulutaş KT, Şahpaz F, Sarıcı İŞ, Uluganyan M, Akçimen B, Çelik M, ve ark. Evlilik öncesi hemoglobinopati taraması: Kadirli, Türkiye beta-talasemi açısından riskli bir bölge mi?. *Türk Biyokimya Dergisi* 2014; 39(3):357-61.
110. Canatan D, Bor S, Arcasoy A, Yeşil N. Elbistan yöresinde Anormal Hb ve HbA2 yüksekliği ile karakterize  $\beta$  -thalassemia taşıyıcı taraması. *Doğa Tr J Med Sci* 1990; 14:555-61.
111. Güler E, Davutoğlu M, Karabiber H, Çelik M, Ekerbiçer HÇ, Paksoy MF. Kahramanmaraş ilinde evlilik öncesi hemoglobinopati taraması sonuçlarının değerlendirilmesi. *TAF Prev Med Bull* 2008; 7(3):243-4.
112. Akhava-Niaki H, Kamangari RY, Banihashemi A, Oskooei VK, Azizi M, Tamaddoni A, ve ark. Hematologic features of alpha thalassemia carriers. *Int J Mol Cell Med* 2012; 1(3):162-167.



### ŞEKİLLER

Şekil 1: Türkiyenin talasemi haritası.....	2
Şekil 2: Hemoglobin molekülünün yapısı.....	4
Şekil 3: İnsan globin zincirlerinin sentez zamanı .....	4
Şekil 4: Hem'in yapısı.....	5
Şekil 5: Hem halkasının oksijene ve histidine bağlanması .....	6
Şekil 6: Alfa benzer globin gen kümesi .....	7
Şekil 7: Alfa benzer globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler.....	8
Şekil 8: Beta benzer globin gen kümesi .....	8
Şekil 9: Beta benzer globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler.....	9
Şekil 10: Hemoglobin varyantlarının ve talasemilerin dünya üzerindeki yayılımı.....	10
Şekil 11: $\alpha^0$ Talasemilere neden olan delesyonel mutasyonların büyüklükleri.....	14
Şekil 12: $\alpha^+$ Talasemiye neden olan çaprazlamala .....	16
Şekil 13: $\alpha^+$ Talasemilere neden olan delesyonel mutasyonların büyüklükleri .....	17
Şekil 14: A) Hemogloblin "trait"li bir hastanın periferik yayması .....	25
B) Bazı hemogloblin "trait"li hastalarda görülebilecek inklüzyon cisimcikli hücre...25	
Şekil 15: Alfa talasemilerde $\alpha/\beta$ globin zincirlerinin biyosentezlerinin oranları .....	27
Şekil 16: Dünyada alfa talasemi insidansı.....	28
Şekil 17: 3,7 kb'lık delesyon belirlenen 1 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	52
Şekil 18: 20,5 kb'lık delesyon belirlenen 63 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	53
Şekil 19: Anemi tespit edilen 3 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	54
Şekil 20: Anemi tespit edilen 10 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	55
Şekil 21: Anemi tespit edilen 17 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	56
Şekil 22: Anemi tespit edilen 21 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	57
Şekil 23: Anemi tespit edilen 35 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	58
Şekil 24: Anemi tespit edilen 82 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	59
Şekil 25: $\beta$ talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenen 73 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	61
Şekil 26 : $\beta$ talasemi taşıyıcısı olduğu belirlenen 79 no'lu örneğin HPLC görüntüsü .....	61

## RESİMLER

Resim 1: PCR temelinde  $\alpha^{-3.7}$ ,  $\alpha^{-20.5}$  ve MED mutasyonları için agaroz jel görüntüsü .....51



## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

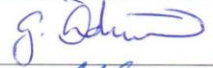





Tablo 1: Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri .....	4
Tablo 2: Hemoglobin molekülünün kalıtsal bozukluklarının sınıflandırılması .....	9
Tablo 3: Türkiye’de belirlenen alfa globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler ..	11
Tablo 4: $\alpha$ talasemiye neden olan non-delesyonel mutasyonların listesi .....	21
Tablo 5: $\alpha$ talasemilerin klinik özellikleri .....	27
Tablo 6: Klinik hematolojik bulgular için normal değerler .....	33
Tablo 7: $\alpha$ globin gen amplifikasyonunda kullanılan primerler ve delesyon türleri .....	43
Tablo 8: Hematolojik değerler .....	47
Tablo 9: Anemi tespit edilen örneklerin hematolojik ve HbA2 değerleri .....	51
Tablo 10: $\beta$ talasemi taşıyıcısı olduğu belirtilen örneklerin hematolojik değerleri.....	60

**EK-1**

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>Araştırmanın Başlığı</b>	Kahramanmaraş İlinde Alfa Talasemi Genotipleri		
	<b>Sorumlu Araştırmacı</b>	Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ		
	<b>Başvuru Tarihi</b>	09.05.2014		
	<b>Protokol No</b>	79		
<b>ARAŞTIRMANIN TÜRÜ</b>	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyalleriyle yapılacak araştırmalar.			
<b>ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER</b>	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Oturum No: 2014/07</b>	<b>Karar No: 01</b>	<b>Tarih: 02.06.2014</b>	
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel YÖNDEN sakınca bulunmadığına toplantıya katılan ÜYELERİN oy birliği ile karar verilmiştir.			

<b>KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>	
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI</b>	Prof. Dr. Gökhan ÖZDEMİR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
Prof. Dr. Gökhan ÖZDEMİR Başkan	Göz Hastalıkları	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin KILINÇ Üye	Tıbbi Biyokimya	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU Üye	Genel Cerrahi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mustafa GÖKÇE Üye	Nöroloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Perihan ÖZTÜRK Üye	Dermatoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mustafa ÇELİK Üye	Tıbbi Biyoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Kamile GÜL Üye	Endokrinoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ekrem KİREÇCI Üye	Tıbbi Mikrobiyoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Hamide SAYAR Üye	Patoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
<b>ŞERH (VARSA)</b>							

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Perihan SÜMER  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : İzmir  
Yabancı Dil :İngilizce, Almanca  
e-posta :perihan\_\_2033@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyokimya	2016
Lisans	KSÜ/Fen Edebiyat Fakültesi-Kimya Bölümü	2012
Lise	Çankırı Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2008

### **YAYINLAR**

Sümer P, Kurutaş EB, Kalender M, Taner SŞ, Çıragil P. Üriner Enfeksiyonu olan Osteoartrit'li Hastaların İdrarında Myeloperoksidaz Enzim Aktivitesi ve Oksidan/Antioksidan Durum. Kahramanmaraş I. Biyokimya Günleri, Poster Sunum, Kahramanmaraş, 07-09 Kasım 2013.

Sümer P, Kurutaş EB, Ateş S, Taner SŞ. Akut Hepatit A'lı Çocuklarda Elastin ve Kollajen. Türk Biyokimya Dergisi 2014 Volume 39. TBD Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu, Poster Sunum, Malatya, 16-18 Ekim 2014.

Kurutaş EB, Güngör M, Kalender M, Taner SŞ, Bakarış S, Sümer P, ve ark. Ratlarda Kas İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine *Urtica Dioica*'nın Koruyucu Etkisi. Türk Biyokimya Dergisi 2014 Volume 39. TBD Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu, Poster Sunum, Malatya, 16-18 Ekim 2014.

Sümer P, Kurutaş EB, Taner SŞ, Öner E, Yüzbaşıoğlu F, Doran F. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Alıç ve Goji Berry'nin Etkileri. 15. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Poster Sunum, Fethiye/Muğla, 23-26 Nisan 2015.

Gül K, Kurutaş EB, Sümer P, Oğuz A, Tüzün D, Şahin M, Taner SŞ, ve ark. Gestasyonel Diabetes Mellitusun Oksidan ve Antioksidan Sistem Parametreleri Üzerine Etkisi. 15. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Poster Sunum, Fethiye/Muğla, 23-26 Nisan 2015.

Öner E, Kurutaş EB, Sümer P, Aksoy A, Yüzbaşıoğlu, Doran F. Deneysel serebral İskemi-Reperfüzyon Oluşturulmuş Ratlarda Anestezik Maddelerin Etkileri. 15. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Poster Sunum, Fethiye/Muğla, 23-26 Nisan 2015.

Öner E, Kurutaş EB, Ateş S, Sümer P. Kronik Hepatit B ve C'li hastalarda oksidatif stres. 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, Sözlü Sunum, Antalya, 3-6 Kasım 2015.