

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ISPARTA VE ÇEVRESİNDEKİ BETA-TALASEMİ  
KALITSAL MUTASYONLARININ DAĞILIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Medine CUMHUR CÜRE**

**BIYOKİMYA ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ**

**ISPARTA**

**2008**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ISPARTA VE ÇEVRESİNDEKİ BETA-TALASEMİ  
KALITSAL MUTASYONLARININ DAĞILIMININ  
ARAŞTIRILMASI

**Dr. Medine CUMHUR CÜRE**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından  
1224-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA**

**2008**

## Tıp Fakóltesi Dekanlığına

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Uzmanlık Tez Savunma Tarihi: 08.04.2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ

Üye : Prof. Dr. Namık DELİBAŞ

Üye : Prof. Dr. Hüseyin VURAL

Üye : Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN

Üye : Doç. Dr. İrfan ALTUNTAŞ

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Fakólte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve Fakólte Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle örnek olan, donanımlı bir laboratuvarın kurulması ve geliştirilmesinin her aşamasında gösterdiği özenle bizlerin de önemli tecrübeler edinmesini sağlayan, değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Namık DELİBAŞ'a, gerek uzmanlık tezimin hazırlanmasında gerekse eğitimim süresince bilgisi, önerileri ve hoşgörüsüyle her zaman katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ'ye, dört yılı aşkın eğitim süresi boyunca bilgileri ve insani değerleriyle her zaman örnek ve destek olan değerli hocalarım; Prof. Dr. Hüseyin VURAL, Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN, Doç. Dr. İrfan ALTUNTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a, laboratuvarında beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan hayat arkadaşım Dr. Erkan CÜRE'ye, neşe kaynağımız biricik kızım Fatma'ya ve emeklerini ödeyemeyeceğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Medine CUMHUR CÜRE

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİL ve TABLOLAR	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hb Molekülü	5
2.1.1. Hb'nin Yapısı ve Fonksiyonu	6
2.1.2. Globin Zincirleri ve Eritropoezin Gelişim Dönemleri	8
2.1.3. Hb'nin Genetik Kontrolü	9
2.1.4. Gen ekspresyonu	10
2.1.5. Globin Zincirlerinin Üretimi	11
2.1.6. $\beta$ -Globin Gen Ekspresyonu	12
2.1.6.1. RNA Splicing	14
2.1.6.1. Poliadenilasyon	14
2.2. $\beta$ -Talasemi	15
2.2.1. $\beta$ -Talaseminin Patofizyolojisi	16
2.2.2. $\beta$ -Talaseminin Klinik Formları	18
2.2.3. $\beta$ -Talaseminin Moleküler Patolojisi	21
2.3. $\beta$ -Talasemiye Neden Olan Mutasyonlar	21
2.3.1. Transkripsiyonel Mutasyonlar	22
2.3.2. RNA İşlenmesi (Processing) ile İlgili Mutasyonlar	22
2.3.2.1. Splice Kavşağındaki Mutasyonlar	22
2.3.2.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar	23
2.3.2.3. İntronlardaki Değişiklikler	23
2.3.2.4. Kodlanan Bölgelerdeki Mutasyonlar	24
2.3.3. RNA Translasyon Mutasyonları	25
2.3.3.1. Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar	25
2.3.3.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları	25

2.3.4. RNA Ayrılması ve Poliadenilasyonla İlgili Mutasyonlar	25
2.3.5. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonu	26
2.3.6. 3' Translasyonu Yapılmayan Bölgedeki Mutasyon	26
2.3.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları	26
2.3.8. Delesyonel Mutasyonlar	27
2.4. $\beta$ -Talaseminin Komplikasyonları	27
2.5. $\beta$ -Talaseminin Tedavisi	27
2.5.1. Gen Tedavisi	29
3. MATERYAL ve METOD	31
3.1. Çalışma Grubu	31
3.2. Örneklerin Toplanması ve Laboratuar Analizleri	31
3.3. $\beta$ -Globin Gen Mutasyonlarının Çalışılması	32
3.3.1. DNA İzolasyonu	32
3.3.2. $\beta$ -Globin İçin PCR Yöntemi	33
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü	33
3.3.4. Revers İnsutu Hibridizasyon Yöntemi	34
3.3.5. Sonuçların Okunması	35
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
6. ÖZET	50
7. SUMMARY	51
8. KAYNAKLAR	52

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

$\beta$	Beta
Hb	Hemoglobin
ark	Arkadaşları
$\gamma$	Gamma
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
HbF	Fetal hemoglobin
$\delta$	Delta
$\alpha$	Alfa
$\zeta$	Zeta
$\epsilon$	Epsilon
Al	Alanin
Gl	Glisin
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DPG	Difosfogliserat
UTR	Şifrelenmeyen bölgeler (Untranslated Region)
Cd	Kodon
mRNA	Mesajcı RNA
tRNA	Taşıyıcı RNA
A	Adenin
T	Timin
LCR	Lokus kontrol bölgeleri (Locus control regions)
bç	Baz çifti
MCV	Ortalama hücre volümü (Mean Corpuscular Volum)
MCHC	Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu (Mean Cellular Hemoglobin Consantration)



**ŞEKİL ve TABLOLAR**

Şekil 1	Hb molekülü	6
Şekil 2	$\alpha$ ve $\beta$ gen kümesi, globin zincirleri ve gelişim dönemlerine göre Hb'ler	7
Şekil 3	Fetus ve infantta eritropoez	8
Şekil 4	İnsan globin genleri	9
Şekil 5	$\beta$ -globin gen ekspresyonu	15
Şekil 6	$\beta$ -talaseminin dünyada dağılımı	16
Şekil 7	$\beta$ -talaseminin patofizyolojisi	20
Şekil 8	Termal cycler	33
Şekil 9	Agaroz jelde DNA örnekleri	34
Şekil 10	Bir $\beta$ -globin strip görünümü	36
Tablo 1	Sonuçların yorumlanması	35
Tablo 2	Katılımcıların cinsiyet dağılımı	37
Tablo 3	Mutasyonların kalıtım şeklinin dağılımı	37
Tablo 4	Taranan mutasyonlar ve görülme sıklıkları	38
Tablo 5	Homozigot mutasyonların dağılım oranları	39
Tablo 6	Birleşik heterozigot mutasyonların dağılımı	40
Tablo 7	Türkiye ve bölge ülkelerinin $\beta$ -talasemi mutasyon dağılımı	45

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Talasemi ilk defa 1925'te Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından, splenomegali ve karakteristik kemik değişiklikleri olan çocuklarda meydana gelen ciddi bir anemi formu olarak tanımlandı. İlk tanımlanan vakaların tümünün Akdeniz bölgesindeki çocuklarda yayınlanmış olması nedeniyle hastalık Yunanca da deniz anlamına gelen "thalassa" sözcüğünden "thalassemia" olarak adlandırıldı. Daha sonra bu bozuklukların Akdeniz çevresi ülkelerle sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri içine alan geniş bir bölgede görüldüğü ortaya çıktı (1,2).

Talasemiler, dünyada en yaygın tek gen bozukluklarıdır. Özellikle Akdeniz bölgesi, Ortadoğu, Hindistan, Uzakdoğu ve Tropikal Afrika'da büyük bir halk sağlığı problemine neden olmaktadır. Günümüzde hızlı nüfus göçünden dolayı Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa kıtasında da yaygın olarak görülmektedir. Elde edilen bilgiler dünya nüfusunun % 4,5'inin etkilenmiş olduğunu göstermektedir (3). Birçok farklı mutant allel, heterozigotların bir ölçüde *falciparum* malaryanın etkilerinden korunmuş olmasından dolayı, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde seçilerek çok yüksek sıklıklara ulaşmıştır (4).

Dünyadaki en yaygın genetik hastalıklardan biri olan beta ( $\beta$ )-talasemi, 11. kromozomun kısa kolunda bir küme olarak lokalize olan  $\beta$ -globin genindeki genellikle nokta mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır (5). Kalıtımla geçen iki  $\beta$ -talasemi mutasyonu  $\beta$ -talasemi majör olarak adlandırılır ki bu durum yeterli hemoglobin (Hb) düzeyini devam ettirmek için yaşam boyu kan transfüzyonu ve demir birikimini önlemek için demir şelasyon tedavisi gerektiren şiddetli bir diseritropoetik anemidir. Kalıtımla geçen hafif kliniğe sahip mutasyonlar  $\beta$ -talasemi intermediadır, heterozigot mutasyonlar normal veya klinik semptom olmadan hafif anemi tablosu gösterirler (6). Bir hastalığın moleküler patolojisi ve klinik olarak çeşitliliği arasındaki ilişkiyi anlamak için bir model olan  $\beta$ -talasemiler moleküler düzeyde araştırılan ilk hastalıklar arasındadır (1).

Hemolitik mikrositik anemiyle ortaya çıkan  $\beta$ -talasemi, diğer bazı Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de en yaygın genetik bozukluklardan biridir.

Türkiye’de  $\beta$ -talasemi ve diğer Hb bozuklukları üzerindeki araştırmalar 1941’de Aksoy ve arkadaşları (ark) tarafından başlatıldı. 1971’de Türkiye’de  $\beta$ -talaseminin sıklığı % 2 olarak bulundu (7,8). Daha sonra Altay ve Sağlık Bakanlığı tarafından 2000-2006 arasındaki verilere dayanılarak verilen bilgilere göre Türkiye’deki  $\beta$ -talasemi ve hemoglobinopatilerin oranı % 4,3 olarak bildirildi. Bu oran farklı bölgelerde % 0,6-13,0 arasında değişmektedir (9). Türkiye’nin değişik bölgelerindeki mutasyon sıklıklarının karşılaştırılması,  $\beta$ -talasemi allellerinin dağılımının her bölgede ciddi yerel varyasyonlarının olduğunu gösterdi. Bölgesel sonuçlar tüm ülkedeki baskın frekansla karşılaştırıldığında Türkiye’nin batı ve güney bölgelerinin toplam dağılımla uygunluk gösterdiği, buna rağmen kuzey ve doğu bölgelerinde, bölge veya nüfus özellikli profil ile karşılaşıldığı görülmektedir. Kuzey ve doğu bölgelerindeki etnik özelliklerin daha fazla korunmuş olması daha büyük oranda bir heterojeniteye neden olmaktadır (10). Popülasyon çalışmalarının çoğunda, bir coğrafik ya da etnik alandaki vakaların % 90’dan fazlası 5–6 mutasyonla sınırlı olduğu görülmektedir. (11). Moleküler çalışmalarda Türkiye’de  $\beta$ -talasemiyle ilişkili 35’den fazla mutasyon gösterildi. En yüksek sıklık % 10 oranıyla Antalya ve çevresinde, % 4,5 oranıyla Muğla’da gözlemlendi (12).

Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye’de beklenenin de üzerinde  $\beta$ -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinik seyirli  $\beta$ -talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı  $\beta$ -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülse de, Türkiye’de  $\beta$ -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30’u aşkın mutasyon tanımlanmıştır; bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir. Klinisyen açısından bakıldığında, moleküler patoloji, hastalık tablosunun değişkenliğini büyük ölçüde yansıtmaktadır (13).

Bazı tedavi seçeneklerine rağmen,  $\beta$ -talasemi için henüz kesin kür sağlayan bir tedavi yoktur. Gamma ( $\gamma$ )-globin gen ekspresyonunu artıran ilaçlar, kemik iliği nakli ve gen tedavisi çok ümit verici görülmesine rağmen henüz rutin kullanıma girecek düzeye gelmedi. Bu nedenle, prenatal tanı ve taşıyıcı takibi gibi önleyici programlara önem verilmektedir. Türkiye’deki  $\beta$ -talaseminin moleküler temelini anlamadaki

ilerlemeler, hastalığı önlemede büyük mesafe sağladı. Genetik danışma ve prenatal tanı, bu bozukluğun klinik ve hematolojik varyasyonların anlaşılmasına ışık tuttu. Türkiye'deki  $\beta$ -talasemiye neden olan mutasyonların çok çeşitli olmasından kaynaklanan zorluğa rağmen prenatal tanı, daha önceki metotların polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) tabanlı tekniklerle geliştirilen kombinasyonlarıyla uygulanabilir olmuştur (14).

Bizim amacımız, Isparta ve çevresindeki mutasyonların tipini ve dağılımını belirlemek suretiyle, moleküler patolojiye göre klinik seyri, hastalığın tespit edilme aşamasında tahmin edebilmesinde klinisyene yardımcı olabilmek, hastalığa önlem alma stratejilerine ve programlarına katkıda bulunabilmektir. Ayrıca bu çalışmanın, Türkiye'nin  $\beta$ -talasemi mutasyon haritasına da katkısı olacağını düşünüyoruz.

## 2. GENEL BİLGİLER

Talasemi kalıtsal bir hata sonucu bir veya daha fazla globin zincirinde yapısal bir bozukluk görülmesinin yapım hızındaki azalmaya bağlı olarak gelişen hipokrom mikrositer anemi ile karakterize heterojen bir grup hastalıktır. Talasemi ilk kez 1925 yılında yaşamlarının ilk yıllarında derin anemi ve splenomegali gelişen bebekleri tanımlayan pediatrist Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir. Benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye çeşitli isimler konulmuştur. George Whipple ve Lesley Bradford 1936 yılında inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiklerini tespit etmişler ve hastalığa Yunanca deniz anemisi anlamına gelen “thalassemia” adını vermişlerdir (15,16). Tanımlanan bu resesif mendelian bozuklukların homozigot veya birleşik heterozigot formlarının Akdeniz çevresi ülkelerle sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri de içine alan geniş bir bölgede ortaya çıktığı görülmüştür (1).

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

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

Türkiye, Asya ve Avrupa arasında bir köprü durumunda olması nedeniyle farklı popülasyonların göçüne uğramıştır. Bu nedenle etnik yapısı diğer Akdeniz

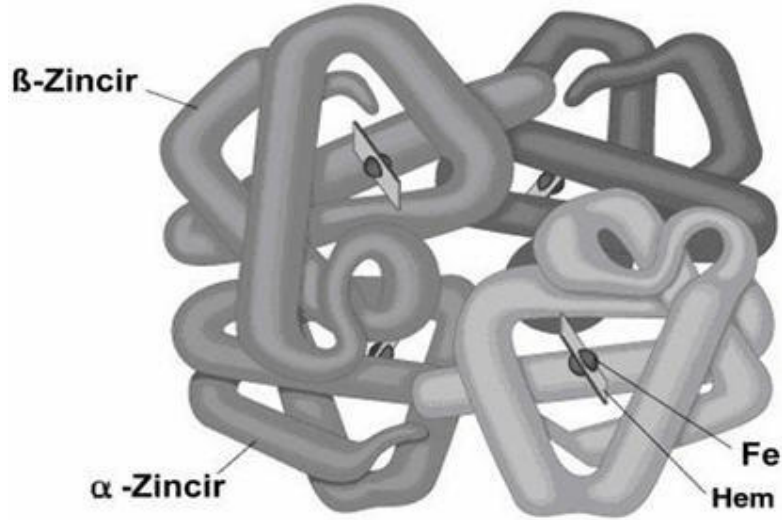
ülkelerine paralel değildir. Bu durum Türkiye’de gözlenen  $\beta$ -talasemi mutasyonlarının allel çeşitliliğinin daha fazla olmasına neden olmuştur (18).

### **2.1. Hb Molekülü**

Hb, globin ve hemden oluşan 64400 dalton ağırlığında tetramer bir yapıdır. İki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül hemden oluşur. Bu tetrameri oluşturan polipeptid zincirleri özgül aminoasitlerden oluşur. Aminoasitlerin sıralanması birincil yapıyı, aminoasitlerin aralarında hidrojen bağlarıyla heliksler biçiminde düzenlenmesi de ikincil yapıyı oluşturur. Üçüncül yapı ise polipeptid zincirlerin katlanarak üç boyutlu bir forma ulaşmasıyla ortaya çıkar. Dört polipeptid zincirinin birleşerek oluşturduğu tek bir molekül ise dördüncül yapıyı oluşturur (4).

Hb, eritrositlerdeki oksijen taşıyıcısıdır. Molekül tetramer yapıda olup her bir alt birimi, demir pigmenti içeren hemden meydana gelir. Bir polipeptid zincir olan globin ve oksijenle hemin birleşmesi sonucu, Hb oksijen taşıma yeteneği kazanır (19).

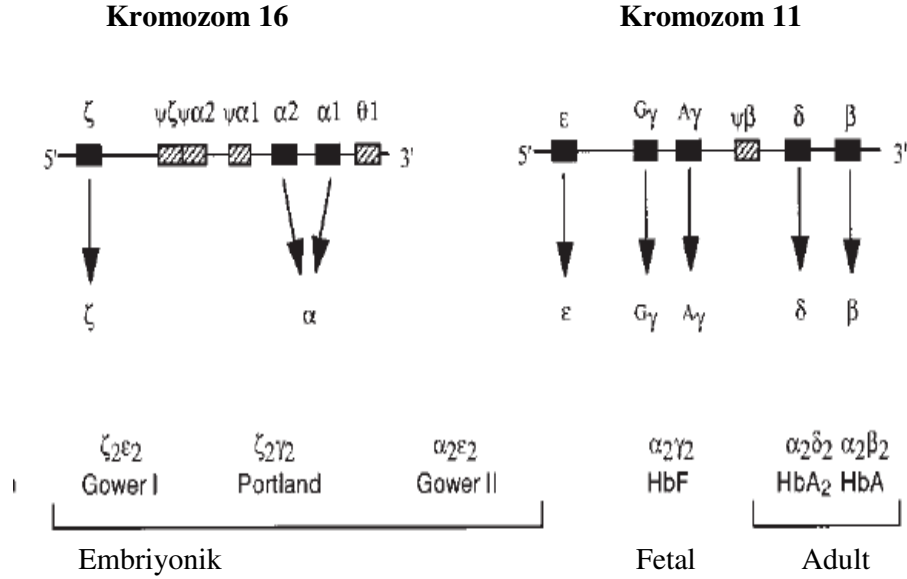
Globüler Hb molekülünün karmaşık yapısındaki hem, tüm insan Hb tiplerinde aynıdır ve hidrofobik bir ortam oluşturan hem cepleri içerisinde yerleşmiştir. Oksijenin kanda taşınması Hb’le geri dönüşümlü kombinasyonlar yapması yoluyla olur (4).



Şekil 1: Hb molekülü (20).

### 2.1.1. Hb Yapısı ve Fonksiyonu

Embriyo, fetüs ve erişkin Hb'leri farklı globin zincirlerine sahiptir. Hb'lerin tümü, her bir globin zincirine bir hemin bağlandığı farklı ikişer çift globin zincirinden oluşan, bir tetramerik yapıya sahiptir (4). Erişkin ve fetal Hb'ler  $\beta$ , delta ( $\delta$ ) ve  $\gamma$  zincirlerinin alfa ( $\alpha$ ) zincirleri ile birleşmelerinden oluşur. Böylece erişkin Hb'ni HbA  $\alpha_2\beta_2$ , HbA<sub>2</sub>  $\alpha_2\delta_2$  ve fetal Hb HbF  $\alpha_2\gamma_2$  yapısındadır. Embriyonik Hb'lerden Hb portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), zeta ( $\zeta$ ) zincirinin  $\gamma$  zinciriyle, Hb Gower 1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ),  $\zeta$  zincirinin epsilon ( $\varepsilon$ ) zinciriyle ve Hb Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ),  $\alpha$  zincirinin  $\varepsilon$  zinciriyle birleşmelerinden oluşur (2,4).  $\gamma$  zincirinin 136. aminoasit pozisyonunda glisin (G1) ve alanin (A1) bulunmasına göre iki farklı fetal Hb mevcuttur.  $\gamma$  glisin (G $\gamma$ ) ve  $\gamma$  alanin (A $\gamma$ ) zincirlerinin gen lokusları da ayrıdır (15).



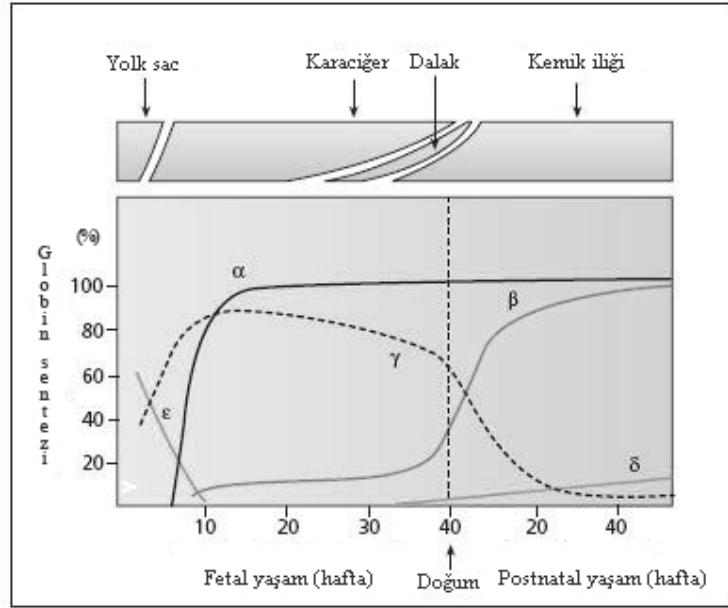
Şekil 2:  $\alpha$  ve  $\beta$  gen kümesi, globin zincirleri ve gelişim dönemlerine göre Hb'ler (21).

Farklı yapıdaki Hb'ler değişen çevrelerin oksijen ihtiyaçlarını sağlamaktadır. Hb'nin başlıca fonksiyonu oksijen bağlama ve bağladığı bu oksijeni dokulara vermektir. Oksijen hem demirine bağlanır. Hemdeki demir, oksijen bağlayabilmesi için +2 değerlikli (ferröz) durumda bulunmalıdır. Oksijenin bağlanması ve dokulara verilmesi sırasında globin zincirlerinin bizzat kendilerinde ve zincirlerin birbirleriyle ilgili bütünlüğünde yapısal değişimler olur. Böylece, oksijenle farklı birleşme eğilimleriyle ilgili Hb molekülünde bir seri şekil değişiklikleri meydana gelir. Oksijene bağlı olmayan Hb molekülünün, oksijenle birleşme yeteneği düşüktür. Oksijen-hem bağlanması olduğunda Hb molekülü daha fazla oksijen tutma yeteneği kazanır. Bu kooperatif etkileşim sonucunda Hb'nin oksijenasyonu yoluyla ilgili sigmoid şekilli eğri elde edilir. Hb molekülünün oksijen bağlaması pH, karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) basıncı, 2,3-difosfoglisarat (DPG), ATP, ısı ve globin zincirlerini etkileyen mutasyonlardan etkilenir ve bu olay eğrinin şeklini değiştirir (15).



### 2.1.2. Globin Zincirleri ve Eritropoezin Gelişim Dönemleri

Globin dönüşümü olarak da adlandırılan olay, çeşitli globin genlerinin gelişimi esnasında meydana gelen değişiklikler sonucu gen ekspresyonunun artışının düzenlenmesine klasik bir örnektir.  $\alpha$  ve  $\beta$  kümelerindeki genler aynı transkripsiyonel düzen içinde sıralanır ve her kümedeki genler gelişim sırasında ekspresyonlarında aynı sekansa sahip olur. Hem  $\alpha$  hem  $\beta$  benzeri globin zincirlerinin de aynı şekilde üretimi vardır (19).



Şekil 3: Fetus ve infantta eritropoez (22).

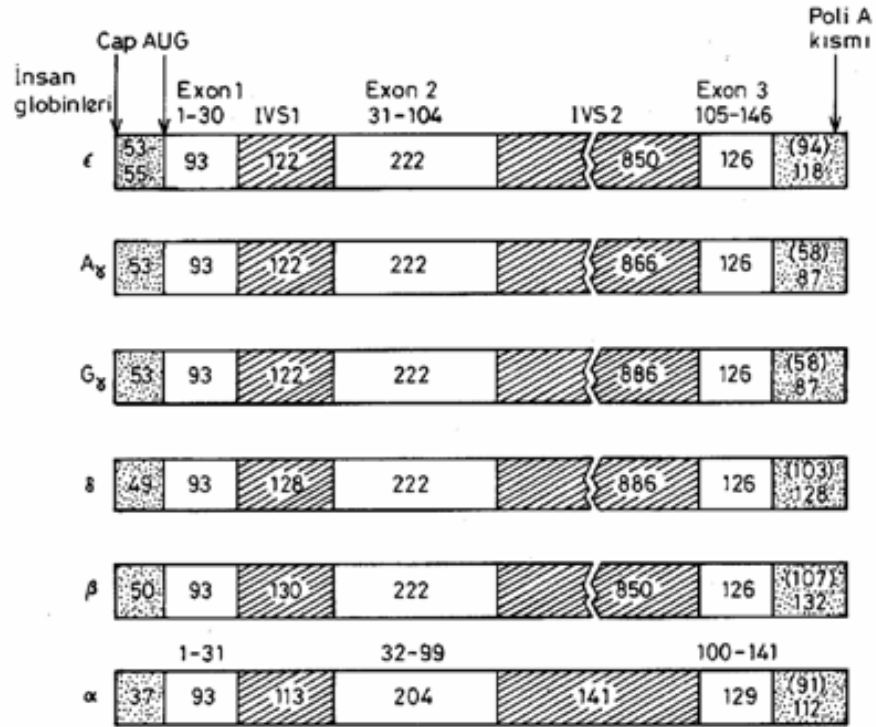
Globin sentezinin geçici dönüşümlerinin, eritropoezin başlıca bölgelerindeki değişikliğe uymaları oldukça ilginçtir. Embriyonik globin sentezi vitellus kesesinde gebeliğin 3. haftasından 8. haftasına kadar olan dönemde oluşur, ancak yaklaşık 5. haftada hematopoezin başlıca yeri olan vitellus kesesinden fetal karaciğere doğru hareket etmeye başlar. HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) fetal yaşam boyunca çoğunluk teşkil eden Hb'dir. Doğumda toplam Hb'nin % 70'ini, erişkin yaşamda ise toplam Hb'nin %1'inden azını oluşturur (19). Bir yaşından itibaren Hb kompozisyonu yaklaşık olarak HbA % 97,5, HbA<sub>2</sub> % 2 ve HbF % 0,5 oranlarında meydana gelir (23).

$\beta$  zincirleri erken gebelikte tespit edilmesine rağmen, sentezleri sadece doğuma yakın belirgin hale gelir ve 3 aylıktan itibaren neredeyse tüm mevcut Hb yetişkin tip

HbA'dır.  $\delta$  zincirinin sentezi doğumdan sonra da devam eder, ancak HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) normal yetişkin Hb'nin yaklaşık % 2'sinden fazlasını oluşturmaz (19).

### 2.1.3. Hb'nin Genetik Kontrolü

Globin zincir genleri iki farklı gen ailesine mensuptur.  $\beta$  zincir ailesi genleri 11. kromozom üzerinde 5'-  $\epsilon - G\gamma - A\gamma - \psi\beta - \delta - \beta - 3'$  şeklinde sıralanmış olarak bulunur. Bu kromozomda birer tane aktif  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  geni ve iki tane de aktif  $\gamma$  geni mevcuttur.  $\alpha$  zincir ailesi genleri ise 5'-  $\zeta 2 - \psi\zeta 1 - \psi\alpha 2 - \psi\alpha 1 - \alpha 2 - \alpha 1 - 3'$  şeklinde 16. kromozomda yer almaktadırlar (15,23). Bu kromozomda bir tane aktif  $\zeta$  ve iki tane aktif  $\alpha$  geni mevcuttur.  $\Psi\beta$ ,  $\psi\zeta$  ve  $\psi\alpha$  genleri gelişimin erken devrelerinde aktif olan daha sonra aktivitesini kaybederek ancak kalıntı şeklinde bulunan psödo genlerdir (15).



Şekil 4: İnsan globin genleri

Genin kodlanan kısımları eksonlardır. Genin uzunluğu boyunca yer alan intronlar genin kodlanmayan kısımlarıdır.  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  globin genlerinde olduğu gibi  $\alpha$  ve  $\zeta$

globin genlerinde de iki küçük intron mevcuttur. İtronlar ve yapısal genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan, genin 5' tarafında bulunan ve şifrelenmeyen bölgeler (untranslated region, UTR) gen kopyalanmasının başlangıcında yer alır (15).  $\beta$ -globin geninin genel yapısı iki kodlanmayan intron ve üç kodlanan ekzon içeren diğer globin lokusları gibidir. Ekzon 2 hem bağlanmasını ve  $\alpha\beta$  dimer formasyonunun meydana gelmesini sağlayan yapıları kodlarken, ekzon 3 de 2,3-DPG bağlanması ve Bohr etkisi için gerekli olan etkileşimleri oluşturan birçok aminoasidi içeren globin alt ünitesini kodlar (24).

#### 2.1.4. Gen Ekspresyonu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan  $\beta$ -globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15,5),  $\beta$ -globin gen kümesi içinde yer almaktadır.  $\beta$ -globin geni  $\beta$ -globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi, 3 ekzon, 2 intron, 3' ve 5' düzenleyici bölgelerden oluşan yaklaşık 1,8 kb üzerinde taşımaktadır (13).

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

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

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

#### **2.1.6.1. RNA Splicing**

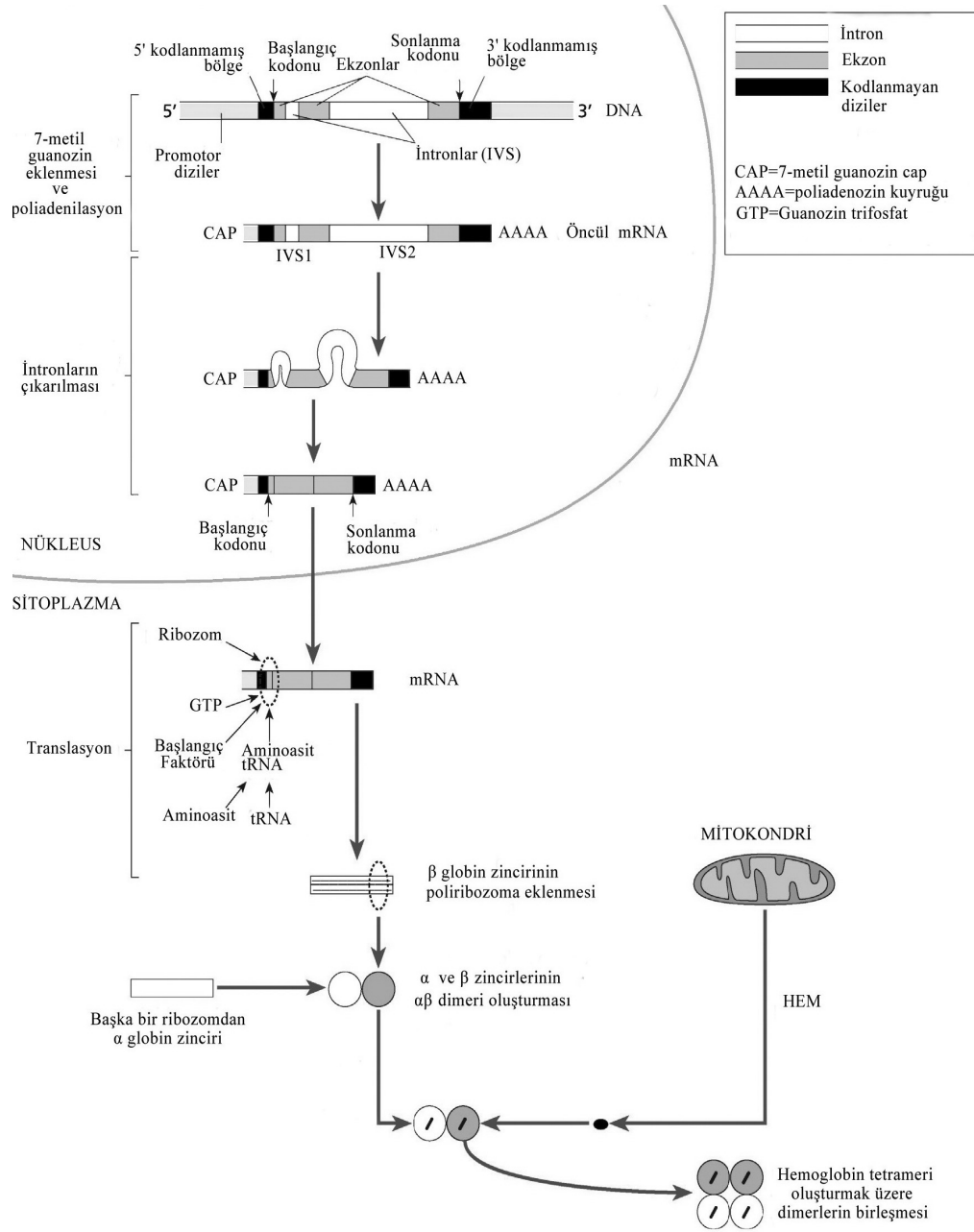
$\beta$ -globin geninin primer RNA transkriptinde yaklaşık olarak 100 ve 850 baz çifti uzunluğunda olan ve birlikte “splice” edilmesi gereken iki ekzon bulunur. Bu işlem, hatasız ve oldukça verimlidir;  $\beta$ -globin transkriptlerinin % 95'inin fonksiyonel

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

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

#### **2.1.6.2. Poliadenilasyon**

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



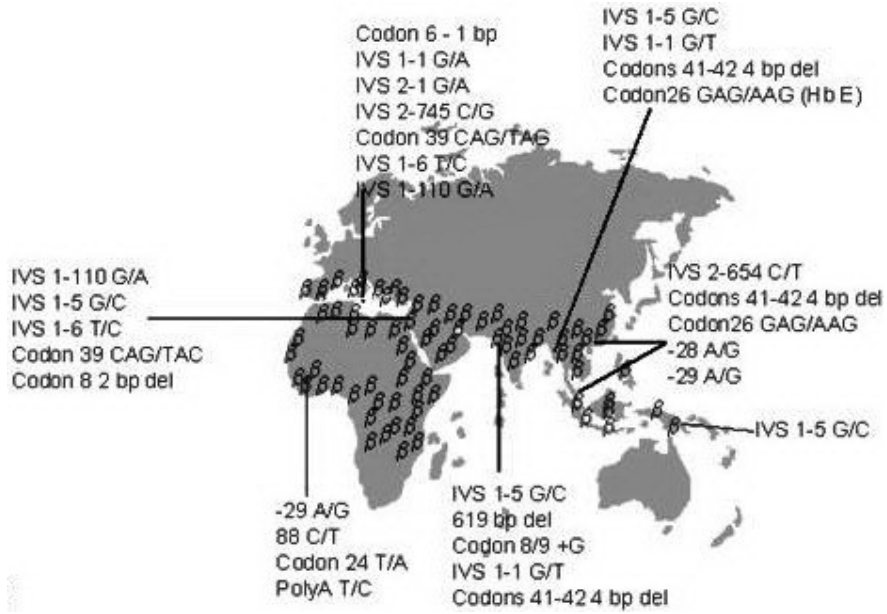
Şekil 5: β-globin gen ekspresyonu (26).

## 2.2. Beta-talasemi

β-talasemi, α- talasemi gibi dünyada en sık görülen talasemi tiplerinden biridir. Bu talasemi Akdeniz Ülkeleri, Kuzey ve Batı Afrika'dan Orta Doğu ve Güney Doğu



Asya Ülkelerini de içine alan bir kuşak tarzında yayılma gösterir (15).  $\beta$ -talasemili hastalarda,  $\beta$ -globin geninin 200'den fazla farklı mutasyonu tanımlanmıştır. Dünyada yüksek sıklığa sahip popülasyonların her birinin özellikle bir bölgede birkaç yaygın mutasyonu taşıdığı görülürken nadir olan mutasyonlara da rastlanabilir (27).  $\beta$ -talasemi, Akdeniz ülkeleri, Afrika ve Güneydoğu Asya gibi malarya için endemik alanlarda yüksek sıklıkta görülür. Hastalığın taşıyıcıları malaryaya karşı genetik olarak korunur ve seçici bir avantaja sahiptir (4,28). Dünya popülasyonunun yaklaşık % 3 kadarı (150 milyon)  $\beta$ -talasemi mutasyonu taşıyıcısıdır (29).



Şekil 6:  $\beta$ -talaseminin dünyada dağılımı (22).

### 2.2.1. $\beta$ -Talaseminin Patofizyolojisi

Kalıtsal hemoglobin bozukluklarının bir grubu olan  $\beta$ -talasemiler,  $\beta$ -globin zincir üretiminin azalmış sentezi ( $\beta^+$ -talasemi) veya tamamen yokluğuyla ( $\beta^0$ -talasemi) karakterizedir.  $\alpha$ /non- $\alpha$ -globin sentez oranının dengesizliği  $\beta$ -talasemi sendromundaki hastalığın şiddetini saptamada majör faktördür (30).  $\beta$ -talasemide,  $\alpha$  geni etkilenmediğinden  $\alpha$ -globinin normal sentezi devam eder. Serbest  $\alpha$  zincirleri normal tetramerler oluşturamaz, bunun yerine eritrosit prekürsörlerinde inklüzyon cisimcikleri yapan presipitat oluşturur. Bu inklüzyonlar, inefektif eritropoezle

karakterize  $\beta$ -talasemide eritroid prekürsörlerin intramedüller yıkımından sorumludur. Her ne kadar  $\beta$ -talasemideki anemide primer neden inefektif eritropoez ise de, dolaşımdaki  $\alpha$ -zincir inklüzyonlarını içeren olgun eritrositlerin yıkımına bağlı gelişen hemolitik bir komponent de vardır (3).

Tedavi edilmemiş ciddi  $\beta$ -talasemide, eritropoez inefektif olarak % 95'den 10 katına kadar artabilir.  $\beta$ -talaseminin derecesinin göstergesi olan inefektif eritropoez,  $\alpha$ -globin zincirlerinin rölatif fazlalığının sayısız zararlı etkilerinin bir sonucudur (1, 31). Bu rölatif fazlalık, normal eritroid olgunlaşmasının birçok aşamasını bozar. Örneğin hücre siklusunun  $G_1$  fazında eritrosit prekürsörlerinin intramedüller ölümü ve genç eritroblastların apoptozisini artırdığı gösterilmiştir (1,32).

$\alpha$ -zincir inklüzyonlarını ihtiva eden olgunlaşmış kırmızı seri hücreleri yaşam sürelerini tamamlamadan, özellikle dalağın mikro sirkülasyonundan geçerken harap olur. Böylece  $\beta$ -talasemide anemi hem inefektif eritropoez hem de eritrositlerin yaşam sürelerinin kısalmasından kaynaklanır. Anemi böbreklerden eritropoietin yapımının artışı için bir uyarıdır. Talasemi majörlü vakalarda Hb'nin büyük kısmını oluşturan HbF'nin oksijene ilgisi fazla olduğundan dolayı doku anoksisine katkıda bulunarak eritropoietin artışına neden olur. Eritropoietinin etkisiyle kemik iliği aktivitesinin artışına bağlı olarak kafatası ve ekstremitelerde kemiklerinde masif bir genişleme ile ilgili olarak ciddi deformiteler oluşur. Anormal kırmızı seri hücreleri daima dalak tarafından dolaşımdan kaldırıldığı için dalak büyür. Böylece gelişen splenomegali, anemiye katkısı olan plazma volümünün artışına ve hipersplenizme neden olur (15). Kemik iliği hiperplazisi esas olarak artmış demir emilimine ve dokulardaki demirin ilerleyici olarak çökmesine neden olur (32).

Doğumdan sonra fetal Hb yapımı durur. Fakat erişkinde az sayıda kırmızı seri öncüleri  $\gamma$  zincir üretimine devam eder.  $\gamma$  zincirleri HbF'i oluşturmak için  $\alpha$  zincirleriyle kombine olduklarından dolayı  $\beta$ -talasemili hastaların kemik iliklerinde rölatif olarak fazla  $\gamma$  zincir yapan hücreler  $\alpha$  zincir presipitasyonunun zararlı etkisine karşı kısmen korunmuş olur (15,24). Ancak HbF'deki bu kısmi fazlalık  $\alpha$ -globin zincirlerinin rölatif fazlasını ve  $\beta$ -globin zincirlerinin azalmış sentezini kompanse etmede yetersizdir (1,33).  $\gamma$ -globin zincir sentezi yapan hücreler selektif yaşama avantajına sahip oldukları için çevre kanında da bulunurlar ve bu sebeple yüksek

fetal hemoglobin seviyesi  $\beta$ -talaseminin karakteristik bir bulgusudur.  $\delta$  zincir sentezi bozulmadığı için HbA<sub>2</sub>'de rölatif veya mutlak artış  $\beta$ -talaseminin diğer karakteristik bulgusunu oluşturur (15).

Aneminin eritrosit transfüzyonlarıyla düzeltilmesi, eritropoez uyarısını durdurarak kemik deformitelerinin oluşması önlenir, büyüme ve gelişme normal olur. Diğer taraftan her bir ünite eritrosit 200 mg civarında demir içerir. Düzenli eritrosit transfüzyonları sonucunda miyokard, karaciğer ve endokrin bezlerde demir birikir (15).

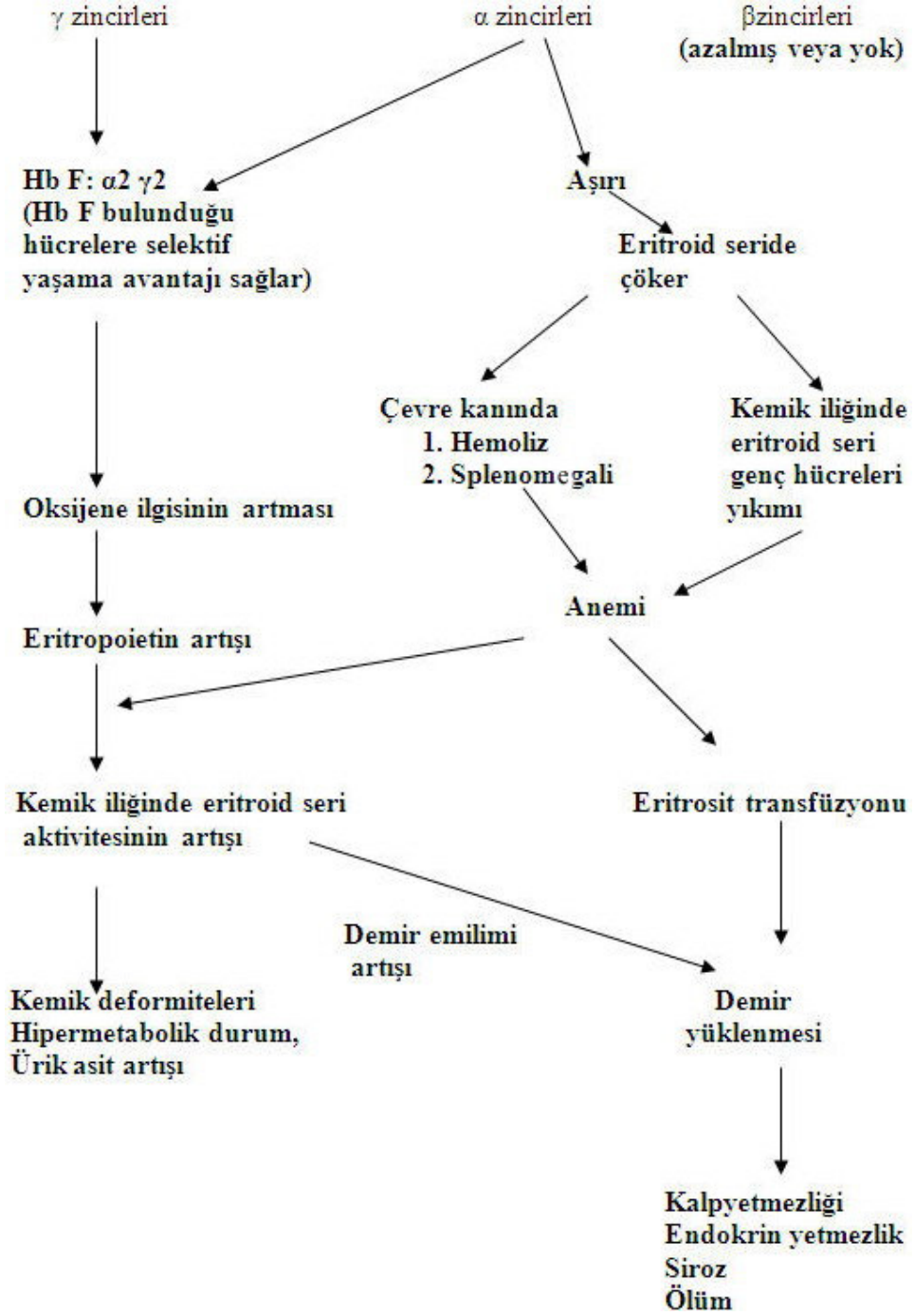
### 2.2.2. $\beta$ -Talaseminin Klinik Formları

$\beta$ - talasemiler dört klinik sendromu kapsar: bunlardan ikisi, " $\beta$ -talasemi trait" ve "sessiz taşıyıcı" olarak adlandırılır ve genellikle semptomsuzdurlar, diğer ikisi medikal takip ve destek gerektiren " $\beta$ -talasemi intermedia" ve " $\beta$ -talasemi majör"dür. Ciddi formlar sıklıkla mutant bir  $\beta$ -globin alleli için homozigot veya birleşik heterozigot olanlardan kaynaklanır, nadir olarak dominant mutasyonlarda heterozigotlardan da kaynaklanır (1,34). "Sessiz  $\beta$ -talasemi" terimi, heterozigotlardaki hafif  $\beta$ -talasemik durumlar için kullanılmaktadır. Bunlarda hematolojik parametreler, HbA<sub>2</sub> ve HbF düzeyleri genellikle normal olduğundan tanımak zordur, sadece *in vitro* zincir sentezinde hafif bir dengesizlik gözlenebilir (35).

Homozigot veya birleşik heterozigotlarda, aneminin erken başlaması, karakteristik kan değişiklikleri ve artmış fetal hemoglobin konsantrasyonlarıyla tanı konabilir ve her iki ebeveynde  $\beta$ -talasemi trait varlığının kanıtlanmasıyla doğrulanabilir. Bu durum hafif anemi, azalmış ortalama hücre volümü (Mean Corpuscular Volüm, MCV) ve ortalama hücre Hb konsantrasyonu (Mean Cell Hemoglobin Concentration, MCHC), Hb'in normal minör yetişkin komponenti HbA<sub>2</sub>'nin konsantrasyonunun yükselmesiyle (genellikle 3,5'i aşması) karakterizedir (1).

$\beta$ - talasemi majörlü hastalar genellikle yaşamlarının ilk yılında tıbbi tedaviye başlarlar ve sonuçta hayatları boyunca düzenli transfüzyon gerekir. Yaşamın daha

sonraki dönemlerinde ortaya çıkmış olanlar veya nadiren transfüzyon ihtiyacı olanlar talasemi intermedia olarak adlandırılır.  $\alpha$ -talaseminin birlikte kalıtımla aktarılması globin zincir dengesizliğinin şiddetini azaltabilir. Yapısal Hb varyantlarıyla birçok farklı etkileşimler klinik fenotiplerin karmaşık bir dizisiyle de sonuçlanabilir. Bu varyantların ikisiyle  $\beta$ - talaseminin etkileşimleri (HbS ve HbE) dünya çapında öneme sahiptir. Sonuç olarak, ilerleyici splenomegali, enfeksiyonlara maruziyet, sosyoekonomik faktörler ve medikal hizmetlerin ulaşılabilirliğini kapsayan edinilmiş ve çevresel faktörlerin bir kısmı hastalığın şiddetini değiştirebilir (1,4).



Şekil 7 : β-talaseminin patofizyolojisi (15).

### 2.2.3. $\beta$ -Talaseminin Moleküler Patolojisi

$\beta$ -talasemiler,  $\beta$ -globin zincirlerinin tamamen yokluğu ( $\beta^\circ$ ) veya üretiminin azalmasıyla ( $\beta+$ ) karakterize, otozomal resesif bozuklukların oldukça heterojen bir grubudur (22,36). Bugüne kadar  $\beta$ -globin genini etkileyen ve  $\beta$ -talasemi fenotipine neden olan yaklaşık 200 farklı moleküler defekt yayınlanmıştır (37).  $\beta$ -talasemiye neden olan mutasyonların büyük bir çoğunluğu primer olarak nokta mutasyonudur, diğerleri nükleotid eklenmesi veya delesyonları içerir (3).

$\beta$ -talasemide genin büyük bir kısmının kaybına neden olan mutasyonlar nadirdir. Mutasyonlar  $\beta$  geninin intronlarında, ekzonlarında ve 5' veya 3' bölgelerinde bulunur. Bazı ekzonlarda baz değişmesi anlamsız (nonsense) mutasyonları oluşturur. İntronlar arasında veya intron-ekzon birleşme noktalarında, mRNA prekürsörlerinin işlenmesi sırasında, intronların uzaklaştırılmasından sonra, ekzonların uç uca gelme mekanizmasıyla ilgili çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. İntron/ekzon birleşme noktalarındaki tek bazlı yer değiştirmeler ekzonların uç uca gelme olayını tamamen önlediği için  $\beta^\circ$ -talasemi fenotipinin oluşmasını sağlar. Bazı intron mutasyonları ise ekzonlar için değişik uç uca gelme bölgeleri oluşturduğundan hem normal hem de anormal mRNA ürünlerinin oluşumuna neden olur. Uygun olmayan bir şekilde uç uca gelen mRNA intron dizileri içerdiğinden işlev göremez. Böylece mRNA normal bir globin zincirinin sentezlenmesinde kalıp görevi yapamaz.  $\beta$ -globin geninin yan bölgelerinde tek baz değişimi bulunabilir. Bunlar  $\beta$ -globin geni transkripsiyonunun başlamasında düzenleyici bölgeyi içine alan mutasyonlardır (15).

### 2.3. $\beta$ -Talasemiye Neden Olan Mutasyonlar

$\beta$ -talasemiye neden olan 200 civarında farklı mutasyon tanımlanmıştır. Her ne kadar çoğu, küme içinde küçük nükleotid değişimleri olsa da, delesyonlar da  $\beta$ -talasemiye neden olabilir. Bütün mutasyonlar  $\beta$ -globin zincirlerinin sentezinin yokluğu ( $\beta^\circ$ - talasemi) veya sentezdeki bir azalmayla sonuçlanır (1).

$\beta$ -globin genindeki mutasyonlar gen ekspresyonunun herhangi bir kademesini etkileyerek  $\beta$ -globin zincir sentezinde bozukluklara neden olur. Bu nedenle  $\beta$  globin

genindeki mutasyonların sınıflandırılması gen ekspresyonu kademelerindeki etkilerine göre yapılabilir.

### **2.3.1. Transkripsiyonel Mutasyonlar**

$\beta$  geninin promotor bölgesinde bulunan konsensus dizilerde oluşan mutasyonlar RNA polimerazın  $\beta$  genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneklerini azaltır,  $\beta$  mRNA transkripsiyonu % 20–30 arasında düşer. Bunların birçoğunda  $\beta^+$  talasemiler görülür,  $\beta$  globin zincir sentezi homozigotlarda veya çifte heterozigotlarda talasemi majörü önlemeye yeterlidir, klinik seyirin hafif olduğu talasemi intermedia fenotipini oluştururlar (38).

### **2.3.2. RNA işlenmesi (processing) ile ilgili mutasyonlar**

#### **2.3.2.1. Splice kavşağındaki mutasyonlar**

İntron I ve intron II'nin başlangıç ve bitiş yerlerindeki donör ve akseptör dinükleotidleri GT ve AG'yi kapsayan mutasyonlar RNA processing'i şaşırtıcı biçimde bozabilir. Bu nükleotidlerdeki değişimler RNA splicing'i bütünüyle bozar ve oluşan mRNA  $\beta$ -globin sentezi için kullanışsızdır; sonuçta  $\beta^0$  talasemi fenotipi oluşur (1,21).

Bu grup, intronların 5' donör ya da 3' akseptör splice birleşmelerindeki ya da birleşme çerçevelerindeki konsensus dizilerinde oluşan mutasyonlarını içerir. 5' intron donör bölgesinde korunmuş GT ve 3' intron akseptör bölgesinde AG dinükleotidlerinin kritik olan yapısı nedeniyle, bu dinükleotidlerdeki mutasyonlar normal splicing oluşumunu engeller. Normal akseptör yerinin inaktivasyonu, RNA prekürsöründe başka bir yerde, diğer akseptör benzeri dizilerin kullanımına yardımcı olur. Bu alternatif yerler, doğru yer olduğunda splicing aparatı tarafından normal olarak kullanılmaz ve “cryptic splice sites” olarak adlandırılır. Kriptik veya akseptör

bölgeler ekzonlar veya intronlar içinde bulunabilir ve tek başlarına kullanılabilceği gibi diğer kriptik bölgelerle veya normal splice bölgeleriyle yarışa girebilir (19).

IVS 1'in 5. pozisyonunda G yerine C, T veya A'nın geçmesiyle oluşan mutant donör alan normalle karşılaştırıldığında splicingi büyük oranda azaltır. Ciddi  $\beta^+$ -talasemiye neden olur. IVS 1'in 6. pozisyonunda T yerine C'in girmesi normal RNA splicingini hafif olarak etkiler ve hafif  $\beta^+$ -talasemi fenotipine neden olur. IVS 1'in 110. pozisyonundaki G>A değişimi normal  $\beta$ -mRNA'nın küçük bir miktarının üretilmesine olanak verir ve ciddi  $\beta^+$ -talasemiye neden olur. IVS 1'in 116. pozisyonundaki T>G değişiminde  $\beta$ -mRNA'nın üretimi çok az veya hiç yoktur ve  $\beta^0$ -talasemi fenotipiyle sonuçlanır. IVS 2'nin 745. pozisyonunda C>G baz değişimi sonucunda bozuk splicing gerçekleşir. Normal donör bölgeden normal akseptör bölgeye kadar splicing değişen miktarlarda meydana gelir ve  $\beta^+$ -talasemiden  $\beta^0$ -talasemiye kadar değişebilen fenotipik yapı ortaya çıkar (21).

### 2.3.2.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar

$\beta$  mRNA'dan intronların etkili bir şekilde artırılması için splice kavşaklarda bulunan diğer anahtar baz dizilimleri de önemlidir. Ökaryotik hücre genlerinde çok sayıda yapılan dizi analizi çalışmaları birçok intron-ekzon bağlanma bölgelerinde benzer dizilimler olduğunu ortaya koymuştur ve bunlar "konsensus diziler" olarak adlandırılmıştır. Bu diziler donör bölgelerdeki ekzonların son üç nükleotidi ile intronun ilk altı nükleotidini, akseptör bölgede ise intronun son on nükleotidi ile ekzonun ilk nükleotidinden oluşur. İşte bu dizilerdeki mutasyonlar sonucunda  $\beta^+$  talasemiler oluşur (19).

### 2.3.2.3. İtronlardaki Değişiklikler

$\beta$  geninin içinde GT ve AG dinükleotidleri splice kavşakları haricinde birçok yerde bulunabilir. Bunlar normal splicing işleminde donör ve akseptör olarak kullanılmazlar. Kriptik bölgeler olarak adlandırılan bu yerler oluşan bazı mutasyonlarla aktive olurlar ve yeni splice bölgeleri oluştururlar. Örneğin Doğu



Akdeniz bölgesindeki ülkelerde ve ülkemizde en yaygın sıklıkta görülen I. intronun 110. pozisyonundaki G→A değişimi yeni bir akseptör bölgenin oluşumuna neden olur. Bu olay kriptik bölgenin aktivasyonu olarak adlandırılır. Bu yeni bölge normalde bulunan akseptör bölge ile yarışma içine girer. Bu durumda yeni akseptör bölge donör bölge tarafından daha çok tercih edilir ve normalde splicing sonucu atılması gereken 18 nükleotidlik bir parça  $\beta$  mRNA içinde kalarak kararsız bir  $\beta$  globin zinciri oluşumuna yol açar. İtron içindeki bu türden değişimler sonucunda genel olarak  $\beta^+$  talasemi fenotipi ortaya çıkar (19,38).

#### **2.3.2.4. Kodlanan Bölgelerdeki Mutasyonlar**

Eksonların içinde de kriptik splice bölgeler vardır. Oluşan mutasyonlar sonucu bu yerler de aktive olarak mRNA processing'i bozarlar. Bunlardan ekzon 1'in 24-27 Cd'ları arasındaki diziler normal splice bölgesindeki dizilere benzerlik gösterir. Ekzon 1 içindeki bu kriptik donör bölge oluşan üç mutasyonla aktive olur. Bu mutasyonlar HbE Cd26 (G→A), HbKnossos Cd27 (G→T) ve Cd24 (T→A)'dür. Cd 26'da oluşan GAG→AAG mutasyonu ile iki tür mRNA ortaya çıkacaktır. Birincisi azalmış olmasına rağmen normal splicing mekanizmasının işlediği glutamik asitle lizinin yer değiştirdiği (glu-lys)  $\beta^E$  mRNA'dır, ikincisi ise aktive olan yeni donör bölge nedeniyle bozulan splicing işleminin sonucu oluşan işlevsel olmayan bir mRNA'dır. HbE'ye en yaygın sıklıkta Uzakdoğu Asya ülkelerinde rastlanır. Cd 24'deki (T→A) mutasyonu ile aminoasit diziliminde bir değişiklik olmaz ama intronlardan arıtılma işlemi oluşan yeni kavşak nedeniyle bozulur. Bu mutasyonlar sonucu orta düzeyde klinik seyir gösteren bir  $\beta^+$  talasemi fenotipi görülür (19,38).

### 2.3.3. RNA Translasyon Mutasyonları

#### 2.3.3.1. Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar

Tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan Cd, translasyonun durdurulması sinyalinin veren durdurucu Cd (stop Cd: UAA, UAG veya UGA) haline gelir. Mutasyonun olduğu Cd'dan itibaren globin zincir üretimi normalden önce durur. Bunlardan en yaygın görüleni Cd39 C→T (CAG→TAG) mutasyonudur. Akdeniz bölgesinde yüksek sıklıkta görülen bu mutasyon sonucu β° talasemi fenotipi ortaya çıkar (19,38).

#### 2.3.3.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'→3' veya 3'→5' yönde) oluşan nükleotid kayması ile mutasyon bölgesinden sonraki Cd'ların şifreleri değişerek farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar. Bu şekilde oluşan bir çerçeve kayması kaçınılmaz olarak normalden önce bir durdurucu Cd oluşumuna da neden olur. Farklı aminoasit dizilimli ve normalden kısa olan bu mRNA normal bir globin zinciri oluşturamaz ve β° talasemi fenotipine neden olur (19,38).

Bunun aksine proteinin karboksil ucunun yanındaki çerçeve kayması, çoğunlukla mRNA'nın normal olarak translasyonuna ya da Hb Tak gibi talasemiden çok varyant bir Hb'ne yol açan uzun globin zincirlerinin üretimine izin verir (19).

### 2.3.4. RNA Ayrılması ve Poliadenilasyonla İlgili Mutasyonlar

Üçüncü ekzondan sonra gelen 3' UTR'de bulunan konsensus dizi-AATAAAA-enzimatik bir işlemi tetikleyerek büyüyen mRNA'nın uygun noktadan kesilerek genden ayrılmasını sağlayan bir sinyal görevi görür. Bu bölgede oluşan nükleotid yer değiştirmeleri poliadenilasyon sinyalinin yapısını bozar ve mRNA'nın ayrılması 900

nükleotid sonra gelen başka bir sinyal bölgesine kadar ertelenir. Dolayısıyla eklenen materyal oluşan pre-mRNA'nın yaklaşık iki kat uzun olmasına ve kararlı yapısının bozulmasına neden olarak  $\beta^+$ -talasemi fenotipi oluşturur (38).

### 2.3.5. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonu

Tüm mRNA'ların post-transkripsiyonel modifikasyonlarının kritik yapısından biri, 5' ucunda RNA'nın "cap" bölgesinin oluşumudur. Ökaryotik mRNA'nın % 90'ında "cap" bölgesinde bir pürin vardır. Asya kökenli bir hastada birinci nükleotidde A→C transversiyonu olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyon, cap'in, 7-metilguanozininin eklenmesini bozabilir ve böylece RNA'yı bozulmaya maruz bırakır (19).

$\beta^+$  talasemi fenotipiyle sonuçlanan +1 A→C yer değiştirmesi sonucu transkripsiyon azalır, başlıklanma (capping) yavaşlar ve mRNA kararlılığı bozulur. Homozigot olarak bulunması halinde bile kişide heterozigot gibi bulgu veren bir fenotip oluşturur (38).

### 2.3.6. 3'-Translasyonu Yapılmayan Bölgedeki Mutasyon

3' UTR'deki AATAAA sekansını etkileyen küçük delesyonlar veya eklenmeler mRNA transkriptinin inefektif ayrılmasıyla sonuçlanır ve orta şiddette  $\beta^+$  talasemiye neden olur (1).

3' UTR'de +1577 nükleotide kadar olan kısmın delesyonu sonucu  $\beta^+$  talasemi fenotipi ortaya çıkar (38).

### 2.3.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları

Başlangıç Cd'u ATG'deki nükleotid değişiklikleri sonucu transkripsiyon başlatılamaz,  $\beta^0$  talasemi fenotipi oluşur (38).

### 2.3.8. Delesyonel Mutasyonlar

$\beta^0$  talasemi fenotipine sahip birçok delesyonel mutasyon tarif edilmiştir. Diğerlerine göre göreceli daha az sıklıkta rastlanılan bu mutasyonların en sık görüleni intron II'den başlayıp  $\beta$  geninin 3' sonuna kadar giden -619 bç'lik delesyondur. Hindistan'da yaşayan  $\beta$ -talasemili olguların yaklaşık % 30'u bu mutasyonu taşır (38). Dutch ( $\gamma\delta\beta$ )<sup>0</sup> talasemide,  $\beta$ -globin geninin kendisi dışında, LCR,  $\epsilon,\gamma$  ve  $\delta$ -globin genlerinin tamamını kapsayan kümenin 5' ucunun 100 kb'lık bölümü delesyona uğrar. Hispanik ( $\delta\beta$ ) talasemi,  $\beta$ -LCR (HSs 2-5)'nin ~35 kb'nı HSs 5'in ~20 kb'nı içeren çok daha kısa bir delesyonla  $\beta$ -globin lokusunun ekspresyonunun bozulmasına neden olur. LCR'nun 5' HS'sinin dördünün (HSs 2-5) delesyonu  $\beta$ -genini inaktive ederken, 3' LCR elementi (HSs1)'nin kaybı  $\beta$ -geninin aktivitesini etkilemez. Sadece  $\beta$ -globin gen lokusunu etkileyen 14 delesyon tanımlanmıştır. Bu 14 delesyonun 13'ü oldukça nadir olsa da HbA<sub>2</sub> düzeyinin yüksekliğiyle ilişkili olması nedeniyle fonksiyonel ve fenotipik olarak ilgi çekicidir. CACCC, CCAAT ve TATA elementlerini içeren  $\beta$  promotorda geniş bir bölgedeki delesyon, artmış HbA<sub>2</sub> düzeyi ve HbF'deki değişken artışların altında yatan mekanizmadan sorumludur. HbF'deki artış, heterozigotlarda hafif ve değişken olsa da, bu delesyonlar açısından homozigot olanlarda  $\beta$ -globinin tamamen yokluğunu baskılamaya yeterlidir ve hafif  $\beta$ -talasemiye neden olur (21).

Son dönemde tanımlanmış, genellikle ekzon 3'ü kapsayan mutasyon ailesi, değişen uzunlukta stabil olmayan globin zincirlerinin üretimiyle sonuçlanır. Buna  $\alpha$ -globin zincirlerinin rölatif fazlalığı eşlik eder ve eritrosit prekürsörlerinde presipite olarak inefektif eritropoeze neden olur, heterozigot olsa bile bu durum aynıdır. Bu dominant olarak kalıtılmış  $\beta^+$  -talaseminin moleküler temelidir (1).

### 2.4. $\beta$ -Talaseminin Komplikasyonları

Yoğun transfüzyon yoluyla dokularda demir birikimi  $\beta$ -talaseminin en önemli komplikasyonudur ve tedavinin başlıca noktasıdır. Transfüzyon almayan hastalarda da, artmış demir emilimi eritroid genişlemenin şiddetine bağlı olarak, vücuttaki

demir yükünde yıllık 2–5 gr'a kadar artışıyla sonuçlanır. Düzenli transfüzyonlar demir birikim hızını artırabilir (1).

Demir yüklenmesinin klinik bulgularının çoğu yetersiz şelasyon uygulanan hastalarda hayatın ikinci dekatına kadar ortaya çıkmasa da, çok genç hastalarda yapılan seri karaciğer biyopsilerinden elde edilen bulgular demirin zararlı etkilerinin bundan çok daha erken başladığını gösterir. Demir birikiminde şelasyon tedavisi uygulanmaması durumunda, kalp, karaciğer ve endokrin bezlerin ilerleyici fonksiyon bozukluğu görülmektedir (16).

Transfüzyon alan fakat şelasyon tedavisi almayan hastalarda, transfüzyon başladıktan sonraki 10 yıl içinde semptomatik kardiyak hastalık bildirilmiştir.  $\beta$ -talasemili hastaların yaşam süresi kalpte biriken demirin miktarıyla orantılıdır (39).

Demirin neden olduğu karaciğer hastalığı yaşlı hastalarda yaygın bir ölüm nedenidir ve sıklıkla hepatit C virüs enfeksiyonuyla şiddetlenir. Transfüzyon başlangıcından sonra iki yıl içinde kollajen formasyonu ve portal fibrozis bildirilmiştir. Modern şelasyon tedavisi esnasında bile yetişkinlerin yaklaşık % 5'inde diabetes mellitus gözlenmektedir (32).

Ön hipofizde demir birikiminin seksüel olgunlaşmanın bozulmasının primer nedeni olduğu, her iki cinsiyetin % 50'sinde bildirilmiştir. Ayrıca 15 yaşın üzerindeki bayan hastaların yaklaşık % 25'inde erken sekonder amenore görülmekte ve uzun dönemde demir birikimi, tiroid, paratiroid ve adrenal bezlerde hasar yapmaktadır (1).

## 2.5. $\beta$ -Talaseminin Tedavisi

$\beta$ -talasemili hastalarda düzenli transfüzyona başlama kararı zor olabilir, aneminin semptom ve bulgularının varlığı ve şiddetli olması, büyüme ve gelişme bozukluğunun mevcut olması gerekmektedir. Genotip incelemesi de bu konuda yardım edebilir. Transfüzyonun amacı, demirin gastrointestinal emilim artışının inhibisyonu, eritropoezisin baskılanması ve aneminin düzeltilmesini kapsamaktadır (39).

Deferoksamine ile parenteral demir şelasyon tedavisinin yararlı etkileri, klinik olarak demir birikiminin komplikasyonları üzerinde sadece şelasyon ajanlarından daha geniş çapta etkilidir. Deferoksamine yaygın olarak uygulanabilen ülkelerde hastalık seyrini oldukça iyileştirmiştir. Ancak pahalı bir tedavi olması nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde hala yaygın olarak kullanılmamaktadır. Deferoksaminin etkinliği ve toksisitesi arasındaki denge vücut demir yükünün düzenli olarak tespit edilmesiyle sürdürülebilir. Klinikte, serum ferritin konsantrasyonu tedavinin etkinliğini değerlendirmede daha yaygın kullanılmaktadır (1).

HLA uygun donörlerden kemik iliği transplantasyonu, dünyada ciddi  $\beta$ -talasemili 1000'den fazla hastada başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Transplantasyonun sonucunu hepatomegali, portal fibrozis ve nakil öncesi inefektif şelasyon tedavisi yapılması büyük oranda etkilemektedir. Talasemili hastalarda kemik iliği replasmanına, kord kanı transplantasyonu, fenotipik olarak benzer olmayan donörlerin kullanılması, intrauterin transplantasyon gibi ilginç deneysel yaklaşımlar da vardır (16).

Bunların yanında birçok deneysel yaklaşım daha vardır. Defepiron gibi deferoksaminden farklı şelatörler denenmiştir. Bir diğeri 5-azacydidine verilerek fetal Hb sentezinin artırılmasıdır. Yine hidroksiüre, bütirik asit bileşikleri ve bu ajanların kombinasyonlarıyla tedavi bazı hastalarda transfüzyon ihtiyacını azaltmak veya ortadan kaldırmak amacıyla bazı çalışmalarda kullanılmıştır.  $\beta$ -talasemilerde fetal Hb sentezini artırıcı tedavilerde beklentiler yüksek olsa da bazı istisnalar dışında bu beklentiler hayal kırıklığıyla sonuçlanmıştır (1).

### **2.5.1. Gen Tedavisi**

Allogenic hematopoetik kök hücre nakli hastalığı iyileştiricidir, fakat bu seçenek hastaların büyük çoğunluğunda kullanılabilir değildir (40). Hematopoetik sistemin genetik hasarların kalıcı olarak düzelmesi ve uzun dönemde, otolog nakilden sonra bu hücrelerin yüksek düzeyde soya özel ekspresyonu kök hücrelere genlerin transferini gerektirir; olgun hücreler ve verilen progenitörler tüm hematopoetik sistemi yeniden oluşturacak ilerleyici kapasiteye sahip değildir (1).

Son yıllarda transdüksiyon metotları ve vektörlerin gelişmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Geride kalan problemler genlerin transferi için daha etkili ve güvenli vektörlerin gelişmesi, genlerin yüksek düzeyde ekspresyonu ve stabilite için gereken bütün sekansların tanımlanmasını içermektedir. Diğer bir yaklaşım, direkt alan yeniden birleşmesi ile hatalı genin düzenlenmesidir, fakat güncel metotlar gerektiği kadar etkin değildir (1).

### 3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamız için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmış ve çalışma Helsinki Deklarasyonu Kuralları'na uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onayları alınmıştır.

#### 3.1. Çalışma Grubu

Çalışma 16 Mart 2006 – 16 Ocak 2008 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmaya dahil edilen 64  $\beta$ -talasemi majör hastası Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hastalıkları Hematoloji Polikliniği'ne başvuran hastalardan, 27  $\beta$ -talasemi taşıyıcısı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na evlilik öncesi talasemi taraması yaptırmak için başvuran kişilerden seçilmiştir.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarında çalışmaya dahil edilme kriteri olarak HbA<sub>2</sub> düzeyinin % 3,5'in üzerinde olması dikkate alınmıştır. HbA<sub>2</sub> düzeyi Bio-Rad Variant Hb Testing System cihazında ölçülmüştür.

#### 3.2. Örneklerin Toplanması ve Laboratuvar Analizleri

$\beta$ -talasemi gen mutasyonlarını saptamak için EDTA'lı tüpe 3 ml venöz kan örneği alındı.

Her iki gruba ait EDTA'lı kan örneklerinden 2 hafta içinde DNA izole edildikten sonra multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile  $\beta$ -talasemi gen dizileri invitro olarak çoğaltıldı. Revers insutu hibridizasyon yöntemi ile Vienna Lab. Austria marka  $\beta$ -globin strip assay kiti kullanılarak mutasyonlar çalışıldı.



### 3.3. $\beta$ -globin Gen Mutasyonlarının Çalışılması

#### 3.3.1. DNA İzolasyonu

İnvitek marka Invisorb Spin Blood Mini Kit (Berlin) kullanılarak, sırası ile aşağıdaki işlemler yapılmak suretiyle DNA izole edildi.

1-EDTA'lı kan örneklerinden 1,5 ml'lik tüplere 200  $\mu$ l koyuldu, üzerine 200  $\mu$ l lizis buffer A eklendi.

2-Örneklerin üzerlerine 20  $\mu$ l proteinaz K koyuldu, vortekslenip 56  $^{\circ}$ C'de termomikserde (Thermo-Rock, Sweden) 10 dakika inkübe edildi.

3-İnkübasyondan sonra tüplerin içine 400  $\mu$ l binding buffer B6 konulup, vortekslendi.

4-Spinfilter (süzgeç) 2 ml'lik başka ependorflara yerleştirildi. Numunelerin hepsi bu ependorfların içindeki spinfiltere pipetlendi ve bir dakika inkübe edildi. 12,000 rpm de iki dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılıp, spinfilterler içindeki materyalle birlikte yeni bir 2 ml'lik ependorfa yerleştirildi.

5-Örneklerin üzerine 500  $\mu$ l lik wash buffer I koyuldu ve 12,000 rpm de bir dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılıp, spinfilterlar tekrar içindeki materyalle birlikte yeni bir iki ml'lik ependorfa yerleştirildi

6-Örneklerin üzerine 800  $\mu$ l wash buffer II koyuldu. 12,000 rpm de bir dakika santrifüj edildi. Alttaki sıvı döküldü ve son hızda dört dakika tekrar santrifüj edildi.

7-Spinfilterler içlerindeki materyalle birlikte 1,5 ml'lik ependorflara yerleştirilip, üzerlerine 200  $\mu$ l elution buffer D konuldu ve bir dakika inkübe edildi. 10,000 rpm de bir dakika santrifüj edildi. Altta kalan materyal (DNA) -20  $^{\circ}$ C de saklandı.

### 3.3.2. $\beta$ -Globin İçin PCR Yöntemi

$\beta$ -globin gen zincirlerine çift primerler kullanılarak PCR multipleks tekniğı ile invitro amplifikasyon yapılmıştır.

PCR karışımı (her bir hasta için); 15  $\mu$ l amplifikasyon karışımı (Vienna Lab, Austria), 5  $\mu$ l taq polimeraz (Applied Biosystems, Germany), 5  $\mu$ l DNA eklendi.

Tüpler, “termal cycler”’a (Applied Biosystems, Germany) yerleştirildi, PCR ilk siklusta 94<sup>0</sup>C’ de 2 dakika denaturasyonu takiben; 94 <sup>0</sup>C de 10 saniye (denatürasyon), 54<sup>0</sup>C’ de 15 saniye (annealing) ve 72 <sup>0</sup>C’de 45 saniye (extend, elongation: uzama) olacak şekilde 35 siklusta yapıldı. Son siklustan sonra 72 <sup>0</sup>C’de 180 saniye süren bir siklus daha yapılarak tamamlandı.



Şekil 8: Termal cycler

### 3.3.3. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR Kontrolü

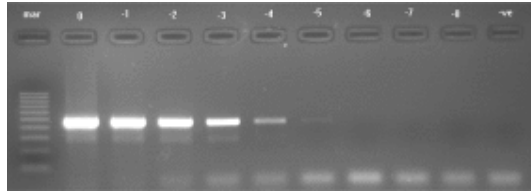
Tris asetik asit EDTA (TAE) hazırlarken 121 gr tris amino metan, 28,55 ml glasiyel asetik asit ve 0,5 M, pH=8 EDTA alındı ve hacim 500 ml olacak şekilde

distile suyla tamamlandı. Bu çözelti 50 kat konsantre olduğundan kullanırken bir kat olacak şekilde distile su ile seyreltildi.

% 2'lik agaroz jel hazırlanırken 50 ml TAE çözeltisi içerisine 0,8 gr agaroz eklendi ve homojenize eriyik oluşuncaya kadar kaynatıldı. Homojen hale gelen karışım içerisine 3 µl etidium bromid eklendi. Karışım bir miktar soğuduktan sonra kalıba dökülerek donduruldu.

Agaroz jelde DNA örneklerinin yürümesi için kullanılan loading dye solüsyonunu hazırlamak için 50 µl % 1'lik bromfenol blue, 50 µl % 1'lik ksilen cyanol, 10 µl % 50'lik gliserol ve 880 µl % 10'luk tris-EDTA kullanıldı. Tris-EDTA, 1 ml 1 M'lık pH=8 olan tris ve 1 ml pH=8 olan EDTA'nın 99 ml distile suda çözülmesiyle hazırlandı.

PCR'dan çıkarılan DNA örneğinden alınan 5 µl ile 1 µl loadin dye solüsyonu karıştırıldı ve jelin kuyucuğuna ekildi. 90 volt, 22 amper akımda 10 dakika yürütüldü. Jel, Kodak Image Station 2000 MM cihazında görüntülenerek PCR'da amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.



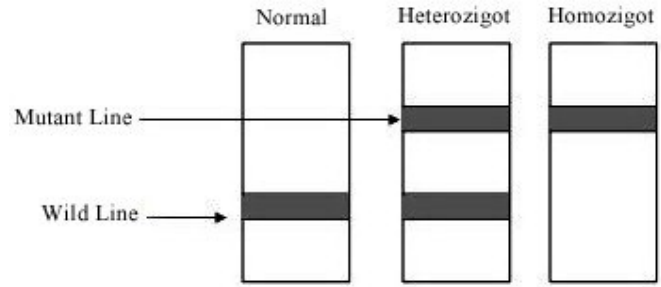
Şekil 9: Agaroz jelde DNA örnekleri

### 3.3.4. Revers İnsitu Hibridizasyon Yöntemi

Amplifikasyon ürünleri oligonükleotid probolar içeren test striplerle hibridize edilerek yirmi iki bölgede mutasyon incelemesi yapıldı.

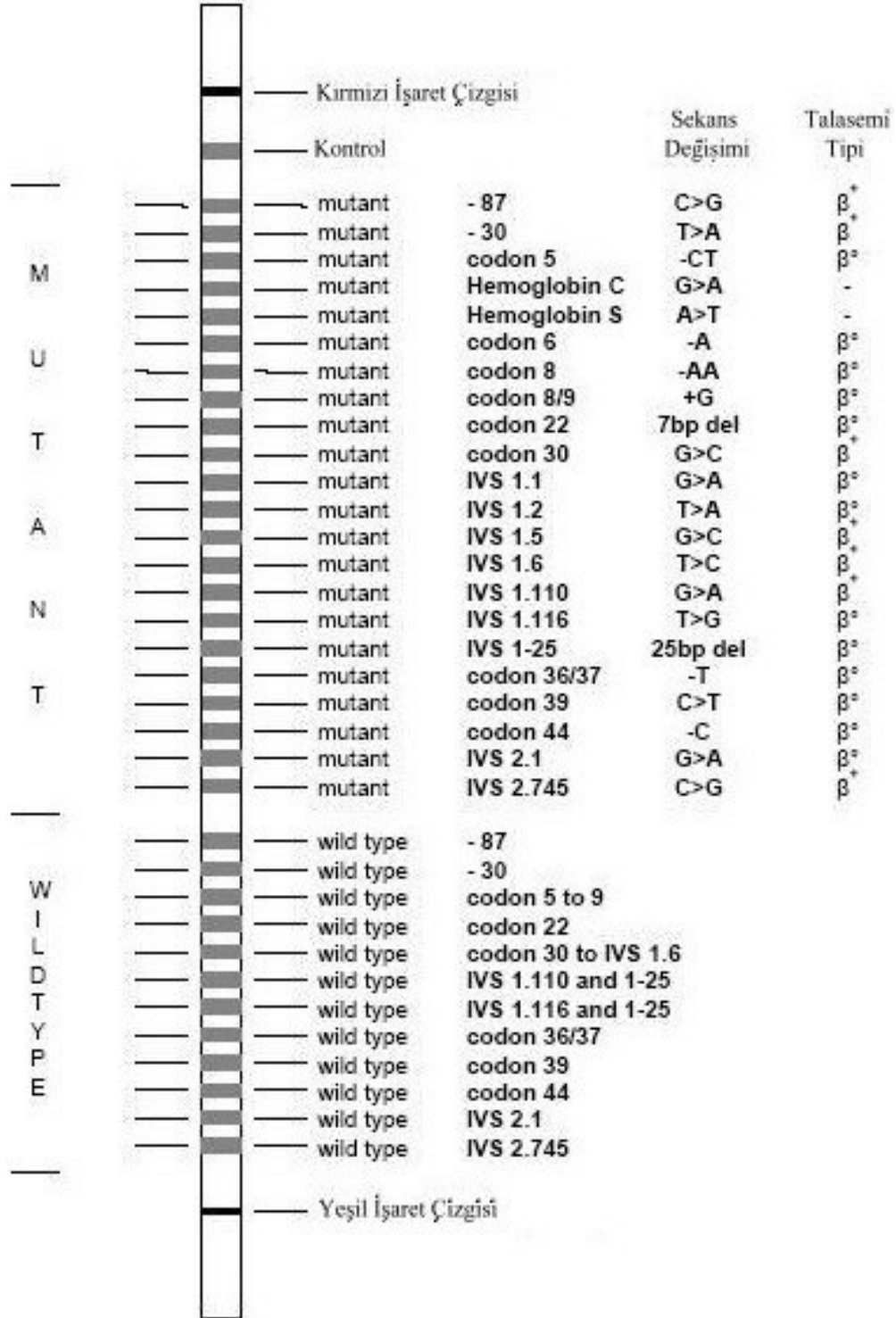
Hibridizasyon işlemi otomatik inkübatör (Auto Lipa Innogenetics, Sweden) içerisinde 2,5 saat süren bir işlemle gerçekleştirildi. Hibridizasyon sonrasında streptomidin alkalin fosfataz kullanılarak ilgili gen dizilerine ait bantların renk gelişimi gözlemlendi.

### 3.3.5. Sonuçların Okunması



Tablo 1: Sonuçların yorumlanması

Wild tipe line	Mutant line	Genotip
Pozitif	Negatif	Normal
Pozitif	Pozitif	Heterezigot
Negatif	Pozitif	Homozigot

Şekil 10: Bir  $\beta$ -globin strip görünümü

#### 4. BULGULAR

$\beta$ -talasemi otozomal kalıtım gösterdiğinden ve çalışmamız dağılım araştırması olduğundan katılımcıların yaş ve cinsiyetleri açısından bir sınır belirlenmemiştir. Cinsiyet dağılımı tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 2: Katılımcıların cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	n	%
Kadın	56	61,5
Erkek	35	38,5
Total	91	100,0

Homozigot ve birleşik heterozigot mutasyonları taşıyan 64 kişi ile heterozigot mutasyon taşıyan 27 kişinin, toplam 156 mutant allelinin moleküler analizinden elde edilen sonuçların dağılımını belirlemede, SPSS programı kullanılarak tanımlayıcı istatistikler uygulandı.

Çalışmaya dahil edilen 91 katılımcıdan, 27’si (%29,7) heterozigot, 36’sı (%39,6) homozigot ve 28’nin (%30,8) birleşik heterozigot formunda mutant allel taşıdığı tespit edildi. Mutasyon tiplerinin toplam dağılımı tablo 3’de gösterilmiştir

Tablo 3: Mutasyonların kalıtım şeklinin dağılımı

Mutasyon tipi	n	%
Heterozigot	27	29,7
Homozigot	36	39,6
Birleşik heterozigot	28	30,8
Toplam	91	100

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Isparta ve çevresinde en yaygın görülen  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS1–110 (% 60) olarak tespit edildi. Bunu IVS2–1 (% 11,61), IVS2-745 (%7,1), IVS1-6 (% 3,87), Cd8 (% 3,87), IVS1-1 (% 2,58), Cd6 (% 1,94), -30(% 1,94), Cd5 (% 1,94), Cd44 (% 1,94), HbS (% 1,29), Cd39 (% 1,29), Cd30 (% 1,29), mutasyonu takip etti. -87, HbC, Cd8/9, Cd22, IVS1–2, IVS1–5, IVS1–116,

IVS1–25, Cd 36i mutasyonları herhangi bir katılımcıda tespit edilmedi. Buna göre dağılım tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Taranan mutasyonlar ve görülme sıklıkları

No	Mutasyon Bölgesi	n (allel)	Yüzde (%)	Mutasyon Tipi	Talasemi Tipi
1	-87	0	0	yok	$\beta^+$
2	-30	3	1,94	heterozigot	$\beta^+$
3	Cd 5	3	1,94	heterozigot	$\beta^o$
4	HbS	2	1,29	heterozigot	
5	HbC	0	0	yok	
6	Cd 6	3	1,94	heterozigot	$\beta^o$
7	Cd 8	6	3,87	heterozigot	$\beta^o$
8	Cd 8/9	0	0	yok	$\beta^o$
9	Cd 22	0	0	yok	$\beta^o$
10	IVS1-1	4	2,58	heterozigot	$\beta^o$
11	IVS1-2	0	0	yok	$\beta^o$
12	IVS1-5	0	0	yok	$\beta^+$
13	IVS1-6	6	3,87	heterozigot	$\beta^+$
14	IVS1-110	93	60	heterozigot+homozigot	$\beta^+$
15	IVS1-116	0	0	yok	$\beta^o$
16	IVS1-25	0	0	yok	$\beta^o$
17	Cd 36i	0	0	yok	$\beta^o$
18	Cd 39	2	1,29	heterozigot	$\beta^o$
19	Cd 44	3	1,94	heterozigot	$\beta^o$
20	IVS2-1	18	11,61	heterozigot+homozigot	$\beta^o$
21	IVS2-745	11	7,1	heterozigot+homozigot	$\beta^+$
22	Cd 30	2	1,29	homozigot	$\beta^+$
	Toplam	156	100		

36 homozigot mutasyonun 31'i IVS1-110 / IVS1-110 (% 86,11), 3'ü IVS2-1 / IVS2-1 (%8,33), 1'i IVS2-745/ IVS2-745 (% 2,77 ) ve 1'i de Cd30 / Cd30 (% 2,77) formunda olduğu görüldü.(Tablo 5)

Tablo 5: Homozigot mutasyonların dağılım oranları

Mutasyon	n	%
IVS 1,110 / IVS 1,110	31	86,11
IVS 2,1 / IVS 2,1	3	8,33
IVS 2,745 / IVS 2,745	1	2,77
Cd 30 / Cd 30	1	2,77
Toplam	36	100

28 birleşik heterozigot mutasyonun 2'si IVS1-110/ Cd8 (% 7,14), 3'ü IVS1-110 / IVS2-745 (% 10,71), 3'ü IVS1-6 / IVS1-6 (%10,71), 2'si -30 / Cd8 (%7,14), 2'si IVS1-110 / Cd44 (% 7,14), 1'i IVS2-1 / IVS2-745 (% 3,57), 7'si IVS1-110 / IVS 2-1 (% 25), 1'i -30 / Cd44 (% 3,57), 1'i HbS / IVS1,110 (% 3,57), 1'i HbS / IVS2,745 (%3,57), 2'si IVS1-6 / Cd39 (% 7,14), 1'i Cd5 / IVS1-110 (% 3,57), 1'i IVS1-1 / IVS1-110 (% 3,57) formundaydı. Ayrıca bir katılımcı, IVS1-110 / IVS2-1 / IVS2-745 (% 3,57) formunda üç ayrı heterozigot mutant allele sahipti. Bu dağılım tablo 6'da gösterilmiştir.



Tablo 6: Birleşik heterozigot mutasyonların dağılımı

Mutasyon	n	%
IVS 1,110 / Cd 8	2	7,14
IVS 1,110 / IVS 2,745	3	10,71
IVS 1,6 / IVS 1,110	3	10,71
-30 / Cd 8	2	7,14
IVS 1,110 / Cd 44	2	7,14
IVS 2,1 / IVS 2,745	1	3,57
IVS 1,110 / IVS 2,1	7	25
-30 / Cd 44	1	3,57
Hb S / IVS 1,110	1	3,57
IVS 1,110 / IVS 2,1 / IVS 2,745	1	3,57
Hb S / IVS 2,745	1	3,57
IVS 1,6 / Cd 39	2	7,14
Cd 5 / IVS 1,110	1	3,57
IVS 1,1 / IVS 1,110	1	3,57
Toplam	28	100

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Talasemi, Hb'nin bir alt ünitesi olan globin zincirlerinin sentezinin yokluğu veya azalmasıyla karakterize genetik bozuklukların bir grubudur. Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Güney Asya, Sri Lanka, Maldivler, Güneydoğu Asya, Malezya, Güney Çin ve Tayvan'ı kapsayan bölgede yaygındır (41).

$\beta$ -talasemi, en yaygın tek gen bozukluklarından biridir.  $\beta$ -globin geninin mutasyonları, Hb'nin  $\beta$ -globin zincirlerinin azalması ( $\beta^+$ ) veya yokluğuyla ( $\beta^0$ ) sonuçlanır. Homozigot  $\beta$ -talasemi hastaları, hastalık insidansının yüksek olduğu ülkelerde ciddi bir halk sağlığı problemine neden olmaktadır. Bu hastalar düzenli kan transfüzyonu ve demir şelasyon tedavisi gerektirirler ve hastaların çok küçük bir oranında başarılı bir kemik iliği naklinden sonra tam kür sağlanır.  $\beta$ -talaseminin kontrolü için doğru prenatal tanı ve taşıyıcıların doğru belirlenmesi gerekir (42, 43).

$\beta$ -talasemi için homozigot ve birleşik heterozigot durumlarında klinik seyir değişken olsa da, transfüzyon almayan vakaların büyük bir çoğunluğunda yaşamının ilk birkaç yılında ölüm meydana gelir. Yeterli transfüzyon, şelasyon ajanlarının uygulanması, desferrioksamin ile çocuklar büyüyüp gelişebilir ve yaşam süreleri yetişkin döneme kadar uzayabilir. Desferrioksamin dezavantajı devamlı infüzyon pompasıyla verilmesi ve pahalı olmasıdır. Yoksul ülkelerin tamamında ilaçlar elde edilse de çoğu çocuğun yetersiz dozajda aldığı görülmektedir ve bunların çoğu aşırı demir yüklenmesinin etkilerinden dolayı çocukluk ve adölesan dönemde ölmektedir (27).

Akdeniz ülkelerinde, tarama ve antenatal tanıyı kapsayan kontrol programları % 80'den % 100'e yakın oranlarda  $\beta$ -talaseminin yeni doğumlarının sıklığını azaltmada başarılı olmuştur. Demografik geçişe maruz kalan gelişmiş ülkelerin çoğunda, hizmet şartları başlıca ekonomik ve kurumsal koşullar tarafından hala güçleştirilmektedir. Bu nedenle etkilenmiş birçok infant ve çocuk tanı konulamadan, tedavi edilemeden veya tedavi altındayken ölmektedir (27).

Geçen birkaç dekattan beri dünya nüfusu önemli miktarda göçten dolayı etkilendi. Bunun için şu anda talaseminin yaygın olarak görüldüğü ülkelere

kaynaklanan göçmenlerin anlamlı bir oranı Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika'dadır. Bu ülkelerde talaseminin hayatı tehdit edici formlarıyla doğma riskini taşıyan etnik azınlık ailelerinin takibi, hematolojik uygulamaların yeni önemli bir yaklaşımı oldu. 25 yılı aşkın süredir bu ülkelerde uygulanan kapsamlı eğitim kontrol programları, genetik danışma ve prenatal tanılar, yeni etkilenmiş kişilerin doğumlarının sayısını sınırlamada başarılı olmuştur (4).

Her ne kadar sıklık bilgileri hala yetersiz olsa da, özellikle fakir ülkeler için bu hastalıkların sağlık hizmetleri üzerinde oluşturacağı yükün bazı göstergelerini elde etme açısından bilgiler yeterlidir. Bu hastalıkların yaygın olduğu ülkelerin yöneticileri ve uluslararası sağlık kuruluşlarının problemin farkına varması ve kontrol altına almasında en ekonomik ve etkili yaklaşımları planlamaya başlaması açısından çok önemlidir (27).

Hemoglobinopatilerin önlenmesinde en etkin yöntemler taşıyıcıların tespit edilmesi, taşıyıcılara genetik danışma verilmesi ve prenatal tanı metodlarının kullanılması ile hemoglobinopati bebek doğumunun önlenmesidir (44). Akdeniz toplumlarında antenatal tanı programları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun başarısı hastalık hakkında halk eğitim programlarının mükemmelliği ve devamında antenatal tanı için etkin tarama rejimleri ve kolaylıklarının geliştirilmesine bağlıdır. Dini, kültürel, kurumsal ve ekonomik nedenlerden dolayı bu tür programların, Hindistan ve Güneydoğu Asya'nın büyük popülasyonlarında uygulanması çok daha zor olabilir. Bir başlangıç olarak, eğitim programları geliştirilmeli, gönüllü tabanlı taşıyıcı taramaları kolaylıkla desteklenmelidir. Ülkelerin bunları takip etmesi, geliştirilmiş popülasyon kontrol programlarının oluşturulmasında temel yaklaşımı oluşturur (27).

$\beta$ -globin gen mutasyonlarının ortaya çıkarılması,  $\beta$ -talaseminin erken prenatal tanısını içeren kesin tanı ve tedavi projeleri için gereklidir. Her ne kadar  $\beta$ -globin geninin tamamında DNA dizinlemesiyle bilinmeyen mutasyonların tespiti uygulanabilir olsa da, çok pahalı olduğundan özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu teknoloji rutin olarak uygulanamamaktadır. Bunun için dizi analizinden önce ucuz, hızlı bir moleküler tespit metoduna ihtiyaç vardır (41). Son senelerde piyasaya çıkarılan ve şu anda üçüncü nesli geliştirilmiş olan  $\beta$ -globin Strip Assay (Vienna

Lab) adlı kit Türkiye’de talasemi tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır. Bu test PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur (13).

Talasemiler moleküler düzeyde oldukça heterojendir.  $\beta$ -talasemili hastalarda,  $\beta$ -globin geninin 200’den fazla farklı mutasyonu tespit edilmiştir. Önemli olarak, dünyada yüksek sıklığa sahip popülasyonların her birinin özellikle belli bir bölgede sadece birkaç yaygın mutasyonu taşıdığı görülmektedir, bunun yanında nadir olanlar da görülebilir.  $\beta$ -talasemi ve HbE’nin yüksek orandaki sıklığının malaryaya karşı heterozigot korumadan kaynaklandığı düşünülse de resmi bulgular hala eksiktir (27). 200 mutasyonun tümünün her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olması, bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör olmuştur (13).

Görülen allel çeşitliliği, Sardunya adası, Kıbrıs gibi küçük ve izole etnik gruplarda daha da azalmakta, örneğin Sardunya adasında sadece iki tip  $\beta$ -talasemi mutasyonu hastalık genlerinin % 99’unu oluşturmaktadır. Akdeniz ülkeleri genelinde bakılacak olursa, yaklaşık 35 mutasyon Akdeniz Havzasına özgü olarak nitelendirilmiş olmakla beraber, bu mutasyonların dağılımı ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Türkiye’de  $\beta$ -talasemi, diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır. Diğer toplumlar için tanımlanan % 95’ini 5–6 mutasyonun oluşturması kuralı Türk toplumu için geçerli değildir (13).

IVS 1-110’un Türkiye genelinde % 40 olan sıklığı, Orta Anadolu’da % 50’yi aşmakta buna karşılık Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da % 25’lere düşmektedir. Türkiye’nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun % 50’sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu ve kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği (-30, -87, FSC8/9, IVS 2-745 gibi) görülmektedir (13).

Dünyada ve Türkiye’de  $\beta$ -talasemi mutasyonlarının sıklığı ve çeşitliliği üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Talmaci ve ark’ın Romanya popülasyonunda yaptığı bir çalışmada 29 katılımcıda 2 homozigot, 1 birleşik heterozigot ve 26 heterozigot

mutasyon tespit edildi. 32 mutant allel 8 farklı tip mutasyon içeriyordu. Bu çalışmaya göre Romanya popülasyonundaki en yaygın  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS 1–110 (% 31,25)'dur. Bunu azalan sıklıkta Cd 39 (% 25), IVS 2–745 (% 15,625), IVS 1–1 (% 12,5), -87 (% 6,25), Cd 6 (% 3,125), IVS 1–6 (% 3,125), poly A (% 3,125) takip etmektedir (6).

Tarama ve prenatal tanıyı da kapsayan kontrol proramlarıyla  $\beta$ -talasemiden etkilenmiş yenidoğanların sıklığının azalmasında % 80–100 oranında bir başarı elde edilmiş olmasına rağmen  $\beta$ -talasemi Yunanistan'da da en yaygın tek gen bozukluğu ve büyük bir halk sağlığı sorunudur. Georgiou ve ark'nın yaptığı çalışmada Yunanistan'da ki en yaygın  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS 1–110 (%42,5) 'dur. Bunu Cd 39 (% 16,9), IVS 1–1 (% 13,2), IVS 1–6 (% 7,2), IVS 2–745 (% 6,9), Cd 6 (% 2,9), IVS 2-1(% 2), Cd 5 (% 0,12), IVS 1-5 (% 0,9) ve 44 bç delesyon (%0,6) takip etmektedir (45).

Makhoul ve ark'nın Lübnan'da yaptığı bir çalışmada  $\beta$ -talasemi majör ve  $\beta$ -talasemi intermedia fenotipli 260 hastanın 520 mutant kromozomunda 20 farklı mutasyon tespit edildi. Mutasyon sıklıkları sırasıyla azalan oranda, IVS 1–110 (% 34,2), IVS 1-1 (% 15), IVS 1-6 (% 14,4), Cd 29 (% 9,6), IVS 2-1 (% 8,6), Cd 5 (% 5), Cd 30 (% 2,7), Cd 8 (% 2,5), Cd 44 (% 1,5), IVS 2-745 (% 1,1),  $\beta$ s (% 1), -87 (% 0,8), IVS 1-5 (% 0,8), -88 (% 0,6), 290 bp delesyon (% 0,6 ), 25 bp delesyon (% 0,4),  $\delta\beta$ -talasemi (% 0,4), Cd 8/9 (% 0,2), Cd 36/37 (% 0,2 ), Cd 39 (% 0,2 ) şeklindedir (28).

Komşu bazı ülkelerle karşılaştırıldığında, oranlarda farklılıklar olsa da Yunanistan, Makedonya, Bulgaristan ve Suriye'de de Türkiye'de olduğu gibi en yaygın mutasyon IVS 1-110'dur. İtalya'da en yaygın mutasyon Cd 39 iken Bulgaristan'da IVS 1-110'a çok yakın oranda görülmektedir. İran ve Azerbaycan'da en sık mutasyon IVS 2-1'dir. Ancak Azerbaycan'da IVS 1–110 oranı da buna yakındır (12).

Altay'ın araştırmasında yer verdiği Türkiye'ye yakın coğrafyadaki ülkelerin ve kendi çalışmalarında tespit ettikleri Türkiye'nin  $\beta$ -talasemi mutasyon dağılımları tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Türkiye ve bölge ülkelerinin  $\beta$ -talasemi mutasyon dağılımı

Mutasyon	Kromozom sayısı								
		Türkiye	Yunanistan	İtalya	İran	Suriye	Azerbaycan	Makedonya	Bulgaristan
IVSI-110 (G-A)	435	40.88	58.32	11.21	6.81	44.4	20.20	47.30	24.75
IVSI-6 (T-C)	110	10.33	7.08	7.54	6.06		7.07	18.56	7.35
IVSII-1 (G-A)	86	8.08	1.18	1.48	15.90	2.7	21.21	0.59	1.71
IVSII-745 (C-G)	66	6.20	4.72	2.78	8.33	16.6	3.03	2.99	4.16
IVSI-1 (G-A)	61	5.73	10.1	3.9	3.5	16.6	2.1	8.9	3.2
FSC8 (-AA)	50	4.69	0.65	0.05	3.03		21.2	1.19	1.22
-30 (T-A)	45	4.22	0.06	-			2.02	1.19	0.24
CD39 (C-T)	31	2.91	12.57	66.84	5.30	11.1	2.02	2.99	24.26
FSC8,9 (+G)	28	2.63	0.06	-	3.78		2.02		0.40
Cd44 (-C)	19	1.78	-	0.11	2.27		3.03		0.49
FSC5 (-CT)	13	1.22	0.35	0.03				2.99	7.10
IVSI-130 (G-C)	9	0.84	-	0.08					
FSC6 (-AA)	7	0.64	1.71	1.9				4.19	5.88
IVSI-116 (T-G)	6	0.56	-	0.05					
PolyA	6	0.56	0.06	-				2.39	0.24
IVSI-5 (G-C)	6	0.56	-	0.11	6.06		1.01		
+22 (G-A)	5	0.46	-	-			1.01		0.49
IVSII-848 (C-A)	5	0.46	0.12	-				1.19	
FSC36-37 (-T)	4	0.37	-	-	1.51		2.02		0.24
IVSI-5 (G-T)	3	0.28	-	-					
-87 (C-T)	2	0.18	-	0.02					
IVSI-1 (G-T)	2	0.18	-	-					
-28 (A-C)	2	0.18	-	-			1.01		
FSC15 (G-A)	2	0.18	-	-					
FSC74,75 (-C)	2	0.18	-	-					
-101 (C-T)	1	0.09	0.18	0.25	0.75				0.24
IVSI-5 (G-A)	1	0.09	10.09	0.05					
IVSI-130 (G-A)	1	0.09	-	-					
CD37 (G-A)	1	0.09	-	-					
Hb knossos	2	0.18	-	-					
Delta beta	22	2.06	0.12	-					
Del-N-Del	2	0.18		-					
Bilinmeyen	29	2.72	1.30	1.24	31.81	8.3	0	2.99	7.84
Total	1064	100	1694	5940	132	36	99	167	408

Komşu ülkelerde  $\beta$ -talasemi mutasyon dağılımları bu şekilde iken Türkiye içinde de farklı bölgelerde birçok çalışma yapılmıştır. Yıldız ve ark'nın Denizli yöresinde yaptıkları çalışmada 53 katılımcının 55 kromozomunda  $\beta$ -talasemi mutasyonu tespit etmişlerdir. Çalışmada en yaygın olarak IVS 1-110 (% 36,4) mutasyonu görüldü. Bunu sırasıyla IVS 1-1 (%16,4), IVS 1-6 (%7,3), IVS 2-745 (%7,3), IVS 1-5 (%1,8), Cd 39 (% 9,1 ), -87 (%3,6 ), Cd 8 (%3,6), IVS 2-1 (% 3,6 ), Cd 8/9 (%1,8), Hb D-Los Angeles (% 3,6) mutasyonları takip etti (7).

Türkiye için  $\beta$ -talasemi oranı % 2 iken Antalya'da bu oran % 10,2'dir. Keser ve ark'nın Antalya'da 103 fetusun koryonik villus örnekleri, amniotik sıvı ve kord kanı kullanarak yaptıkları prenatal tanı çalışmasında  $\beta$ -talasemi mutasyonları ve dağılımına bakmışlardır. En yaygın mutasyonun IVS 1-110 (% 50,4) olduğu görülmüştür. Bunu IVS 1-6 (% 9,7), IVS 2-1 (% 7,7), IVS 2-745 (% 7,7), IVS 1-1 (% 5,7), Cd 5 (% 4,7), -30 (% 2,7), Hb S (% 2,7), Cd 8 (% 1,7), Cd 39 (% 1,7), IVS 2-848 (% 0,9), IVS 1-5 (% 0,9), Cd 44 (% 0,9), Cd 22 (% 0,9) mutasyonları takip etmiştir (8).

Altay'ın Türkiye'nin değişik coğrafi bölgelerinden gelen hastalarda tespit edilen 1064 mutant kromozom üzerinde yaptığı çalışmada 32 farklı mutasyon görülmüştür. Dağılım bölgeler arası oranlarda farklılık gösterse de toplam dağılımda en yaygın mutasyonun IVS 1-110 (% 40,88) olduğu görülmüştür. Bunu takiben sırasıyla azalan oranlarda en yaygın 10 mutasyon, IVS 1-6 (% 10,33), IVS 2-1 (% 8,08), IVS 2-745 (% 6,20), IVS 1-1 (% 5,73), FSC 8 (% 4,69), -30 (% 4,22), Cd 39 (% 2,91), FSC 8/9 (% 2,63), Cd 44 (% 1,78), FSC 5 (% 1,22) şeklindedir (12).

Türkiye ve komşularında dağılım bu şekilde iken uzak ülkelerde mutasyonların çeşidi ve sıklığı oldukça farklılık göstermektedir. Perea ve ark'nın Meksika'da yaptıkları bir çalışmada en sık mutasyon GLN39TER (%31,4) olarak tespit edilmiştir. Bunu azalan oranlarda IVS 1-1 (% 14,5), IVS 1-110 (% 14,5), -28 (% 6), IVS 1-5 (% 6), HBD/HBB 104 Kb delesyon(% 6), MET1VAL (% 3,6) ve daha düşük oranlarda birçok mutasyon görülmüştür (46).

Colah ve ark'nın Hindistan'da  $\beta$ -talasemi mutasyonları ve klinik fenotip üzerine etkileri hakkında yaptıkları bir çalışmada 278 talasemi majör hastasının 556

mutant kromozomunda mutasyon dağılımına bakmışlardır. 23 mutasyon tipinden en sık 5 tanesi IVS 1-5 (% 52,5), 619 bç delesyon (% 14,1), Cd 8/9 (% 9,0), IVS 1-1 (% 6,7), Cd 15 (% 5,4) şeklinde sıralanmaktadır (47).

$\beta$ -talasemi gibi kalıtımla kuşaklara aktarılan hastalıkların yaygınlığında ve devamlılığında şüphesiz ki akraba evliliklerinin büyük önemi vardır. Asadi-Pooya ve ark'nın İran'da yaptığı bir çalışmada talasemi majörlü hastaların yaşı, cinsiyeti ve aralarındaki akrabalıklar sorgulanmıştır. Bu sırada akrabalık oranı, akraba evliliklerini azaltmak için evlilik öncesi danışma ve bunların otozomal resesif hastalıkları önlemede etkisine bakılmış.  $\beta$ -talasemili hastaların %40,6'sında ilk kuzen evliliğinden doğan çocuklar olduğu görülmüştür.  $\beta$ -talasemili hastaların aile içi evlilikleri ve normal toplum karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür (48). Türkiye akraba evlilikleri açısından yüksek oranlara sahiptir. Türk Nüfus ve Sağlık Araştırması'nın beş yılda bir ortaya koyduğu verilere göre 1983'den beri bu oran % 20-25'de seyretmektedir. Bütün akraba evliliklerinin yaklaşık % 70'i ilk kuzenler arasında gerçekleşmekte ve bunlar çoğunlukla amca çocukları olmaktadır (49).

Yukarıda örnek olarak verdiğimiz çalışmalarda da görüldüğü gibi,  $\beta$ -talasemi klinik fenotipte olduğu gibi moleküler düzeyde de oldukça geniş bir heterojenite göstermektedir. Ülke içindeki farklı bölgelerde mutasyonların sıklığında ve çeşitliliğinde görülen farklılıklar, ülkeler arasında daha da artmaktadır. Kıtalar arasında bir karşılaştırma yaptığımızda ise tamamen farklı tip mutasyon oranlarıyla karşılaşılmaktadır. Bu durumda farklı etnik, dinsel ve kültürel grupların içe dönük yaşam tarzlarının etkisinin küçümsenemeyeceği açıktır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün, "Hemoglobin Hastalıklarını Kontrol Programına" göre; kalıtsal kan hastalıklarını önlemek için halkın bilgilendirilmesi ve genel eğitimi, taşıyıcıların belirlenmesi için popülasyon taramaları, lokal mutasyonların tanımlanması, tedavi, genetik danışmanlık ve prenatal tanının birlikte koordineli olarak yapılması gerekmektedir. Türkiye'de hemoglobinopati ile mücadele amacıyla 30.12.1993 tarih ve 21804 sayılı resmi gazetede, 3960 sayılı "Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele" kanunu çıkarılmıştır. Ardından Sağlık Bakanlığı tarafından Antakya, Mersin, Muğla ve Antalya'da, Kalıtsal Kan Hastalıkları



Araştırma ve Tedavi merkezleri kurularak, evlenecek çiftlerde talasemi taraması zorunlu hale getirilmiştir. 23.06.2000 tarihinde kayıt, tarama, eğitim, prenatal tanı, konvansiyonel tarama amacıyla “Ulusal Hemoglobinopati Konseyi” kurulmuş ve bu konsey, Sağlık Bakanlığı Ana-Çocuk Sağlığı-Aile Planlaması ve Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü ile koordineli çalışmalar yapmaya başlamıştır. Devam eden çalışmalarla, Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi “Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele” kanununa bağlı olarak “Kalıtsal Kan Hastalıklarından Hemoglobinopatiler İle Mücadele ve Kontrol Programı İle Tanı ve Tedavi Merkezleri Yönetmeliği” çıkarmışlardır (50).

Bütün bu yasal düzenleme ve uygulamalara rağmen gerçek bir başarı sağlanabilmesi, yaygın ve kuşaklarla aktarılan bir hastalık için uzun bir zaman gerektirmektedir. Bu süreçte hasta olanlar için kolay, ucuz ve uygulanabilir tedavi yöntemlerinin araştırılmasına önem verilmelidir. Aynı zamanda etkilenmiş yeni doğumların önlenmesi için artık yasal bir zorunluluk da olan evlilik öncesi danışmanlık hizmetlerine ve prenatal tanı uygulamalarına daha fazla önem verilmelidir. Ülkemiz gibi çok sayıda etnik, dini, kültürel çeşitliliği barındıran ve akraba evlilik oranının oldukça yüksek olduğu toplumlarda halk eğitim ve bilgilendirme çalışmalarına öncelik verilmeli ve özen gösterilmelidir.

Bizim çalışmamızda gerek ülkemizde gerekse diğer bölge ülkelerinin birçoğunda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak Isparta ve çevresinde de en sık  $\beta$ -talasemi mutasyon tipi IVS1-110 olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında en sık ikinci mutasyon Antalya’da IVS1-6, Denizli’de IVS1-1 olarak yayınlanmışken Isparta’da IVS2-1 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamız, Isparta ve çevresindeki mutasyonların tipini ve dağılımını belirlemek suretiyle, moleküler patolojiye göre klinik seyri, hastalığın tespit edilme aşamasında tahmin edebilmesinde klinisyene yardımcı olacak, hastalığa önlem alma stratejilerine ve programlarına katkıda bulunacaktır. Ayrıca bu çalışmadaki veriler hastaların klinik takiplerindeki verilerle birleştirilirse ve katılımcı sayısı artırılırsa hastalığın genetik geçişinin moleküler mekanizması ile fenotip arasındaki bağlantı hakkında çok daha yararlı bilgiler elde edileceğini düşünmekteyiz. Türkiye’nin  $\beta$ -talasemi mutasyon haritasına da katkısı olacaktır. Genetik danışmanlık esnasında moleküler patolojinin bilinmesi sayesinde kişiye daha açık ve güvenilir bilgiler

verilebilecek dolayısıyla çocuk sahibi olma kararlarında alınabilecek erken önlemlerle gerek tıbbi abortusların uygulanma gerekliliği gerekse hasta çocuk doğma riski azaltılacaktır.

## 6. ÖZET

### ISPARTA VE ÇEVRESİNDEKİ BETA-TALASEMİ KALITSAL MUTASYONLARININ DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

Dünyada en yaygın genetik hastalıklardan biri olan Beta ( $\beta$ )-talasemi, 11. kromozomun kısa kolunda küme olarak lokalize olan  $\beta$ -globin genindeki genellikle nokta mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Hemolitik mikrositik anemiyle ortaya çıkan  $\beta$ -talasemi, diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de en yaygın genetik bozukluklardan biridir.

Çalışmaya dahil edilen 64  $\beta$ -talasemi majör hastası Süleyman Demirel Üniversitesi Hastanesi Çocuk Hematoloji Polikliniği’ne başvuran hastalardan, 27  $\beta$ -talasemi taşıyıcısı Süleyman Demirel Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı’na evlilik öncesi talasemi taraması yaptırmak için başvuran kişilerden seçildi.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarında çalışmaya dahil edilme kriteri olarak HbA<sub>2</sub> düzeyinin % 3,5’in üzerinde olması dikkate alındı.

Araştırmamıza dahil edilen 91 katılımcıdan, 27’si (% 29,7) heterozigot, 36’sı (% 39,6) homozigot ve 28’nin (% 30,8) birleşik heterozigot formunda mutant allel taşıdığı tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Isparta ve çevresinde en yaygın görülen  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS1–110 (% 60) olarak bulundu. Bunu IVS2–1 (% 11,61), IVS2–745 (% 7,1), IVS1–6 (% 3,87), kodon8 (% 3,87), IVS1–1 (% 2,58), kodon6 (% 1,94), -30(% 1,94), kodon5 (% 1,94), kodon44 (% 1,94), HbS (% 1,29), kodon39 (% 1,29), kodon30 (% 1,29), mutasyonu takip etti. -87, HbC, kodon8/9, kodon22, IVS1–2, IVS1–5, IVS1–116, IVS1–25, kodon 36i mutasyonları herhangi bir katılımcıda tespit edilmedi.

Çalışmamızdaki veriler tanı koyma ve tedavi planlamada klinisyene yardımcı olabilir ve ülkemizin talasemi haritasının belirlenmesinde katkıda bulunabilir. Genetik danışmanlık esnasında moleküler patolojinin bilinmesi sayesinde kişiye açık ve güvenilir bilgiler verilebilir, çocuk sahibi olma kararlarında alınabilecek erken önlemlerle tıbbi abortusların uygulanma gerekliliği ve hasta çocuk doğma riski azaltılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Talasemi,  $\beta$ -globin, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), mutasyon, Isparta

## 7. SUMMARY

### INVESTIGATION OF DISTRIBUTION OF BETA-THALASSEMIA HEREDITARY MUTATIONS IN ISPARTA AND AROUND OF IT

Beta ( $\beta$ )-thalassemia is the most common genetic disease in worldwide due to point mutation on  $\beta$ -globin gene which is localized on short arm of 11. chromosome as a cluster. It is inherited as autosomal recessive.  $\beta$ -thalassemia which is presented with hemolytic anemia is the most common genetic disease in Turkey as well as in Mediterranean countries.

Sixty four patients with  $\beta$ -thalassemia carriers which were admitted to Pediatric Hematology outpatient clinic of Suleyman Demirel University and 27 patients with  $\beta$ -thalassemia carriers which were admitted to Biochemistry Laboratory of Suleyman Demirel University for screening before marriage were included to this study. The inclusion criteria of  $\beta$ -thalassemia carriers were accepted as HbA<sub>2</sub> levels greater than 3,5%.

From total 91 participants, 27 (29,7%) were heterozygote, 36 (39,6%) were homozygote and 28 (30,8%) were detected as carrying compound heterozygote form of mutant allele. In our findings, most common  $\beta$ -thalassemia mutation was IVS1-110(60%) in Isparta and around of it. Other mutations followed it respectively; IVS2-1 (11,61%), IVS2-745 (7,1%), IVS1-6 (3,87%), IVS1-1 (2,58%), codon6 (1,94%), -30 (1,94%), codon5 (1,94%), codon44 (1,94%), HbS (1,29%), codon39 (1,29%), codon30 (1,29%). Mutations of -87, HbC, codon8/9, codon22, IVS1-2, IVS1-5, IVS1-116, IVS1-25, codon 36i were not detected in any participant.

Results of this study may be help to the clinicians to diagnose and plan of treatment and may contribute to determine the map of thalassemia in our country. With molecular pathology knowledge during genetic consultancy, clear and reliable information can be given to the individuals and necessity of medical abortus, with early precaution in deciding to have child, and risk of ill child birth may be reduced.

**Key words:** Thalassemia,  $\beta$ -globin, polymerase chain reaction (PCR), mutation, Isparta

## 8. KAYNAKLAR

1. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalassemyias. *Medical Progress* 1999; 341: 99-109.
2. Weatherall D. The Thalassemyias: The Role of Molecular Genetics in an Evolving Global Health Problem. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 385-392.
3. Tuzmen S, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating  $\beta$ -talasemia mutations. *Blood Reviews* 2001; 15: 19-29.
4. Higgs DR. Gene Regulation in Hematopoiesis: New Lessons from Thalassemyia. *Hematol* 2004; 1: 1-13.
5. Kayışlı ÖG, Keser İ, Canatan D, Şanlıoğlu A, Özeş ON, Lüleci G. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 175-177.
6. Talmacı R, Traeger-synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrilă L. Scanning of  $\beta$ -globin gene for identification of  $\beta$ -thalassemyia mutation in Romanian population. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 232-240.
7. Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. Beta-thalassemyia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Hematol* 2005; 22: 19-23.
8. Keser İ, Manguoğlu E, Kayışlı ÖG, Kurt F, Mendilcioğlu İ, Şimşek M, Bağcı G, Küpesiz A, Lüleci G. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -talasemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 251-253.
9. Kılınç Y. Hemoglobinopathies in Turkey. *Turk J Hematol* 2006; 23: 214-216.
10. Tadmouri GO, Tuzmen S, Özçelik H, Ozer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN. Molecular and Population Genetic Analyses of  $\beta$ -Thalassemyia in Turkey. *Am J Hematol* 1998; 57: 215-220.
11. Chakrabarti P, Gupta R, Mishra A, Rai M, Singh VP, Dash D. Spectrum of  $\beta$ -thalassemyia mutations in North Indian states: A  $\beta$ -thalassemyia trait with two mutations in cis. *Clin Biochem* 2005; 38: 576-578.
12. Altay Ç. The Frequency and Distribution Pattern of  $\beta$ -thalassemyia Mutations in Turkey. *Turk J Hematol* 2002; 19: 309-315.
13. Başak AN. Talasemi Moleküler Genetiği. Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu 12-13 Mart 2005; 99-106.
14. Tüzmen S, Tadmouri, GO, Ozer A, Baig SM, Özçelik H, Basaran S, Basak AN. Prenatal Diagnosis of  $\beta$ -Thalassaemia and Sickle Cell Anaemia in Turkey. *Prenat Diagn* 1996; 16: 252-258.
15. Günçağ D. Hemolitik Anemiler. *Klinik Hematoloji*. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargin D, Nalçacı M, Aktan M, Beşışık SK (editör) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2003; s: 87-152.
16. Weatherall DJ. Disorders of globin synthesis: The thalassemyias. *Williams Hematology*, 7 nd Ed. In Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). New York: McGraw-Hill, 2006; pp: 633-666.

17. Flint J, Harding SM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 215-262.
18. Akar E, Ozdemir S, Hakki Timur I, Akar N. First observation of homozygous hemoglobin hamadan (B 56 (D7) GLY-ARG) and beta thalassaemia (-29 G>A)-hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. *Am J Hematol.* 2003;74: 280-282.
19. Yurter HE. İnsan genomu. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik*, 6. baskı, Türkçe çeviri. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editör). Ankara, Güneş Kitabevi. 2005; s:17-31.
20. Olgun A. Proteinlerde yapı-işlev ilişkileri. *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası*, çeviri 2. baskı. İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A (editör). Ankara, Güneş Kitabevi, 2007; s: 102.
21. Joy HO P, Thein SL. Gene regulation and deregulation: a  $\beta$  globin perspective. *Blood Reviews* 2000; 14: 78-93.
22. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Genetics* 2001; 2: 245- 255.
23. Fathallah H, Atweh FG. DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews* 2006; 20: 227-234.
24. Thein SL.  $\beta$ -Thalassaemia Prototype of a Single Gene Disorder with Multiple Phenotypes. *Int J Hematol* 2002; 76: 96-104.
25. Aktaş D. Moleküler hastalığın ilkeleri: hemoglobinopatilerden dersler. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik*, 6. baskı, Türkçe çeviri. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editör). Ankara, Güneş Kitabevi. 2005; s: 181-201.
26. Bain BJ. Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis. *Haemoglobinopathy Diagnosis*, 2 nd Ed. Blackwell Publishing, 2005; p: 10.
27. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 704-712.
28. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA. Genetic Heterogeneity of Beta Thalassaemia in Lebanon Reflects Historic and Recent population Migration. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 55-56.
29. Kutlu M, Çekmiş H, Başak M, Osman N, Açıkgöz Ö, Sevindir İ, Özcan ZÖ. Talasemiler. *Bakırköy Tıp Dergisi* 2006; 2: 33-40.
30. May C, Sadelain MA Promising Genetic Approach to the Treatment of  $\beta$ -Thalassaemia. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 276-280.
31. Nathan DG, Gunn RB. Thalassaemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am J Med* 1966; 41: 815-830.
32. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassaemia. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1135-1146.
33. Wood WG. Increased HbF in adult life. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 177-213.
34. Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body  $\beta$  thalassaemia. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 3924-3928.

35. Gonzalez-redondo JM, Stoming TA, Kutlar A, Kutlar F, Lanclos KD, Howard EF, Fei YJ, Aksoy M, Altay C, Gurgey A. A C---T substitution at nt--101 in a conserved DNA sequence of promotor region of the beta-globin gene is associated with "silent" the beta-thalassemia. *Blood* 1989; 73: 1705–1711.
36. Faa V, Meloni A, Moi L, Ibba G, Travi M, Vitucci A, Cao A, Rosatelli MC. Thalassemia-like carriers not linked to the  $\beta$ -globin gene cluster. *Br J Haematol* 2006; 132: 640–650.
37. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal EA Syllabus of Thalassemia Mutations. *The Sickle Cell Anemia Foundation* 1997.
38. Topal K. Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde  $\beta$ -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi 1998.
39. Forget BG. Thalassemia syndromes. Hematology, Basic Principles and Practice 3 nd Ed. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P (eds). New York: Churchill Livingstone, 2000; pp: 485–510.
40. Sadelain M, Rivella S, Lisowski L, Samakoğlu S, Riviere I. Globin gene transfer for treatment of the  $\beta$ -thalassemias and sickle cell disease. *Best Prac Res Clin Haematol* 2004; 17: 517–534.
41. Chinchang W, Viprakasit V, Pung-amritt P, Tanphaichitr VS, Yenichitsomanus P. Molecular analysis of unknown  $\beta$ -globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with  $\beta$ -thalassemias and  $\beta$ -globin variants. *Clin Biochem* 2005; 38: 987-996.
42. Barragan E, Bolufer B, Perez ML, Prieto F, Sanz M. Molecular detection of Spanish  $\delta\beta$ -thalassemia associated with  $\beta$ -thalassemia identified during prenatal diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 195–198.
43. Cao A, Galanello R. Effect of consanguinity on screening for talasemia. *N Engl J Med* 2002; 347: 1200–1202.
44. Gümrük F. Hemoglobinoopatilerin Tanı ve Tedavisinde Yenilikler. Türk Hematoloji Derneği 9. mezuniyet sonrası eğitim kursu 2006; 62–64.
45. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL. Distribution and frequency of  $\beta$ -thalassemia mutations in Northwestern and central Greece. *Eur J Haematol* 2003; 70: 75–80.
46. Perea FJ, Magana MT, Cobian JG, Sanchez-lopez JY, Chavez ML, Zamudio G, Esparza MA, Lopez-guido B, Ibarra B. Molecular spectrum of  $\beta$ -thalassemia in the Mexican population. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 150–152.
47. Colah R, Nadkarni A, Gorakshakar A, Phanasgaonkar S, Surve R, Subramaniam PG, Bondge N, Pujari K, Ghosh K, Mohanty D. Impact of  $\beta$  globin gene mutations on the clinical phenotype of  $\beta$  thalassemia in India. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 153–157.
48. Asadi-pooya AA, Doroudchi M. Thalassemia major and consanguinity in Shiraz city, Iran. *Turk J Haematol* 2004; 21: 127–130.
49. Tunçbilek E, Özgüç M. Application of medical genetics in Turkey. *Turk J Pediat* 2007; 49: 353–359.

50. Dönbak L. İnsan Hemoglobin Varyantları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 2005; 8: 13-22.