

40826

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ALFA TALASEMİLİ BİR AİLENİN
MUTASYON TİPLERİNİN MOLEKÜLER
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Kıymet AKSOY

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Dr. Gürbüz POLAT
UZMANLIK TEZİ
ADANA/1995

Hemoglobinopatilerin yaygın olarak görüldüğü Çukurova Bölgesinde orak hücre anemisi ve beta talasemilerin sıklığı ve moleküler niteliği iyi tanımlanmıştır. Bölgede yaygın olduğu düşünülen alfa talasemilerin sıklığını ve moleküler niteliğini belirleme gereksinimi nedeniyle bu çalışma planlanmıştır. Çukurova Bölgesindeki alfa talasemileri moleküler düzeyde tanımlamayı amaçlayan tez çalışmamın bu alandaki çalışmalar için bir ilk adım olmasını diliyorum.

Biyokimya bilgi ve birikimiyle eğitimimi pekiştiren, tezimin yönetimindeki duyarlılık ve titizliliğiyle ileri bilimsel çalışmalar için beni özendiren ve tez dönemim boyunca beni sürekli destekleyen tez yöneticim olan hocam Prof. Dr. Kıymet AKSOY'a ve severek başladığım biyokimya uzmanlığı eğitimimde bana deneysel düşüncüyü aşılıyarak temel ve klinik biyokimya birikimlerini aktaran ve bu alanda kendimi geliştirmemi sağlayan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Güneş YÜREGİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarım araştırma görevlilerine, yüksek lisans öğrencilerine ve bölüm çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tez çalışmasında hedef örnek seçiminde ilk hastayı sağlayan Ç.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Rikkat Koçak hocama, bazı ölçümlerimizdeki katkılarından dolayı Nükleer Tıp Anabilim Dalı ve Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı öğretim üyeleri, yönetici ve çalışanlarına, tez çalışmamı TF 94-4 nolu proje ile destekleyen Ç. Ü. Rektörlüğüne ve Araştırma Fonuna ayrıca teşekkür ederim.

Sevgili eşime sabır ve desteğinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Dr. Gürbüz POLAT

Adana/ 1995

İÇİNDEKİLER

I. Giriş ve Amaç.....	1
II. Genel Bilgiler.....	3
1. Hemoglobin Molekülünün Temel Yapısı.....	3
1.1. Hemoglobin molekülü.....	3
1.2. Globin sentezi.....	5
1.3. Globin gen yapısı.....	5
1.4. Globin genlerinin organizasyonu.....	6
1.5. α -Benzeri globin genlerinin yapısı ve salınımı.....	9
2. α -Talasemiler.....	10
2.1. α -Talasemideki moleküler defektler.....	10
2.2. α -Talasemi-1.....	11
2.3. α -Talasemi-2.....	12
2.4. Nondelesyon α -Talasemi.....	16
3. α -Talasemilerin Klinik Tablosu.....	17
3.1. Sessiz taşıyıcılık.....	20
3.2. α -Talasemi trait.....	21
3.3. Hemoglobin H hastalığı.....	21
3.4. Hemoglobin Barts Hidrops Fetalis.....	24
4. α -Talaseminin Coğrafik Dağılımı ve Sıklığı.....	25
4.1. Dünyada α -talasemi sıklığı.....	25
4.2. Türkiye'de α -talasemi.....	27
4.3. Çukurova Bölgesinde α -talasemi.....	27
III. Gereç ve Yöntemler.....	29
1. Araç ve Gereçler.....	29
1.1. Cihazlar.....	29

1.2. Kimyasal maddeler.....	30
1.3. Diğer malzemeler.....	30
2. Örnek Toplama.....	30
3. Analiz Yöntemleri.....	31
3.1. Hematolojik İncelemeler.....	31
3.1.1. Coulter sayımı.....	31
3.1.2. Hemoglobin elektroforezi.....	31
3.1.3. Hemoglobin A ₂ ölçümü.....	33
3.1.4. Hb F tayini.....	34
3.1.5. Ferritin ölçümü.....	35
4. Moleküler Çalışmalar.....	39
4.1. DNA elde edilmesi.....	39
4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile alfa gen amplifikasyonu..	41
4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	41
4.2.2. 10XPCR tamponunun hazırlanması.....	42
4.2.3. Alfa globin gen primerleri.....	42
4.2.4. Alfa gen amplifikasyonu.....	43
4.2.5. PCR programı.....	44
4.3. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) yöntemiyle β -globin gen mutasyonlarının incelenmesi.....	44
4.3.1. 10xreaksiyon tamponu.....	44
4.3.2. Amplifikasyonda kullanılan primerler.....	45
4.3.3. β -Globin gen mutasyonlarının saptanmasında kullanılan amplifikasyon koşulları.....	46
4.3.4. PCR Protokolü.....	46
4.4. Agaroz jel elektroforezi.....	46
IV. Bulgular.....	48
V. Tartışma.....	64
VI. Sonuç.....	74
VII. Özet.....	75
VIII. Summary.....	77
IX. Kaynaklar.....	79

ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

Şekiller	Sayfa	Tablolar	Sayfa
Şekil 1	4	Tablo 1	4
Şekil 2	6	Tablo 2	18
Şekil 3	7	Tablo 3	19
Şekil 4	8	Tablo 4	37
Şekil 5	14	Tablo 5	39
Şekil 6	15	Tablo 6	42
Şekil 7	26	Tablo 7	43
Şekil 8	50	Tablo 8	43
Şekil 9	56	Tablo 9	45
Şekil 10	58	Tablo 10	46
Şekil 11	59	Tablo 11	49
Şekil 12	60	Tablo 12	50
Şekil 13	61	Tablo 13	51
		Tablo 14	52
		Tablo 15	53
		Tablo 16	54
		Tablo 17	55
		Tablo 18	62
		Tablo 19	63

GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşamın erken döneminde oluşan, splenomegali ve kemik değişiklikleri ile ilişkili ciddi bir anemi formu ilk kez 1925 yılında Cooley ve Lee tarafından tanımlanmıştır. Bu durum daha sonra 'thalassemia' olarak adlandırılmıştır. 1940'tan sonra bu bozukluğun gerçek genetik karakteri gösterilmiştir. Daha sonra talasemilerin globin sentezindeki kalıtsal anomalliklerle sonuçlanan bir grup bozukluk sonucu oluştuğu gösterilmiştir (110).

Globin yapımının kalıtsal anomallikleri iki grupta incelenmektedir. İlkinde, orak hücreli anemide olduğu gibi, globin zincirlerinin birinde kalıtılmış yapısal değişiklik vardır. Böyle anormal hemoglobinler daha az etkinliğe sahip olarak sentezlenmekte ve normal erişkin hemoglobininin daha hızlı yıkılabilmekte ve anormal hemoglobinlerin fiziksel özelliklerinden kaynaklanan klinik anomalliklere neden olmaktadır. İkinci grupta ise (talasemiler), globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentez hızı kalıtsal defektlerle azalmaktadır. α - ve β -benzeri globin gen düzenlemeleri arasında bir denge gelişimi söz konusu olup talasemilerdeki defekt bu dengenin kaybından oluşmaktadır (21,110).

α -Zinciri, fetal ve yetişkin hemoglobinlerinde görüldüğünden α -zincir yapım eksikliği yetişkin yaşamında olduğu kadar fetal dönemde de hemoglobin sentezini etkilemektedir. Fetal yaşamdaki α -zincir sentezinin azalışı, γ zincir artışı, γ_4 tetramer formu (Hb Barts) ile ve yetişkin yaşamında α -zincir eksikliği, β zincirinin artışı, β_4 tetramer formu (Hb H) ile sonuçlanmaktadır. α -Talasemi, 4 α -globin geninin bir ya da daha fazlasındaki delesyon ve defekt sonucu gelişmektedir (71).

Dünyada yaygın bir dağılım gösteren α -talasemiye ülkemizde de sıkça rastlanmaktadır. Çukurova bölgesi, Türkiye'nin güneyinde yer alan, geçmişten

günümüze birçok göçle karşılaşan ve heterojen nüfus yapısına sahip bir bölge olup, kalıtsal kan hastalıklarının büyük bir kısmını sıklıkla barındırmaktadır. α -Talasemi araştırmalarında moleküler düzeyde incelemeler gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada ise α -talasemi sıklığının fazla olduğu bilinen Çukurova bölgesinde delesyonel α -talasemi olgularının mutasyon tipleri moleküler düzeyde incelenmek istenmiştir.



GENEL BİLGİLER

1. Hemoglobin Molekülünün Temel Yapısı:

1.1. Hemoglobin molekülü:

Hemoglobin molekülü, dört globin zincirinin oluşturduğu demir içeren bir 'hem' halkasına sahiptir (13). Hem kısmı tüm hemoglobin formlarında aynıdır. Hem grubunun ferrous demiri oksijeni (O_2) bağlar ve taşır. Normal yetişkin hemoglobinin yaklaşık %98'i hemoglobin A ve kalanı (%2) Hb A₂ ile Hb F'tir (yaklaşık %1) (66).

Hemoglobin A, iki α -globin zinciri ve iki β -globin zinciri içerir. Her α -zinciri 141 aminoasit ve buna karşılık β -zinciri ise 146 aminoasit içerir. Bu zincirler homoloji gösterir. Hb A₂'nin her molekülünde iki α -globin zinciri ve iki δ -zinciri bulunmaktadır, δ -zinciri 146 amino asit içerir. Fetal ve erken postnatal dönemde predominant hemoglobin HbF'tir. Hb F, iki α -globin zinciri ve iki γ -globin zincirine sahiptir, γ -globin zinciri 146 amino asit içerir (13,21,66).

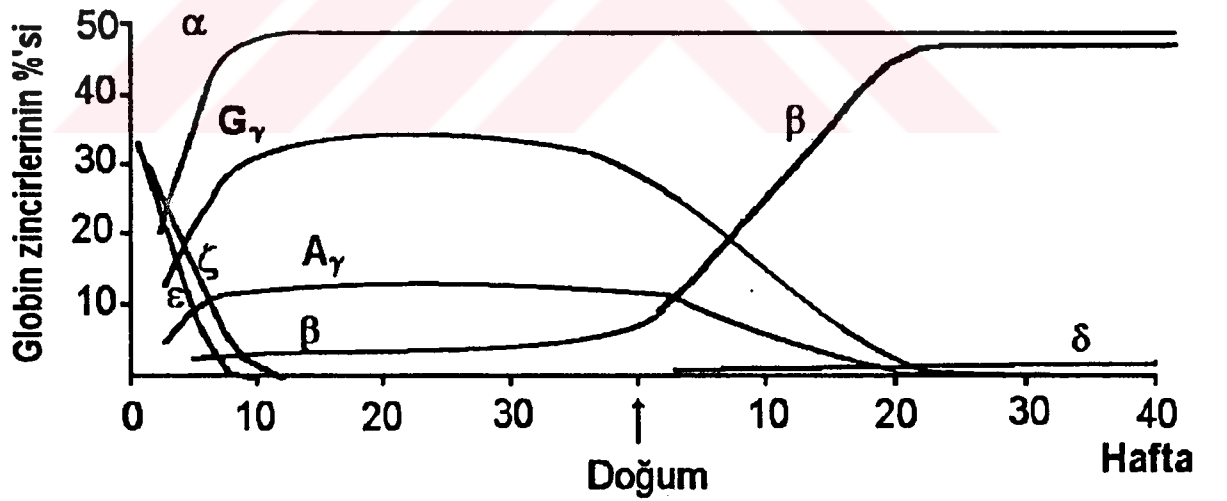
Erken embriyonik gelişme sırasında tanımlanan hemoglobinler Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) ve Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$)'dir (Şekil 1 ve tablo 1) (13,21,66).

Embriyonik hemoglobinler, gebeliğin yaklaşık yirminci haftasına kadar plasental yolk kesesinde biçimlenen büyük çekirdekli eritrositler olan megaloblastlarla dolaşıma geçmektedir. Karaciğerde hematopoezin başlaması ile fetal kırmızı hücreler biçimlenmektedir. Embriyonik hemoglobinden fetal hemoglobine değişim yolk kesesinden fetal eritropoeze geçiş ile çakışmamaktadır. ζ -Globinden α -globine değişim yolk kesesinde olmaktadır. ε -globinden γ -globine değişim, α -globin kümesindekinden

biraz daha geç olmaktadır. β -zinciri gebeliğin 8-12. haftasında dolaşımında görülmektedir. Hb F'den Hb A'ya olan başlıca değişim doğumla olmaktadır (57).

Tablo 1. İnsan yaşamında yer alan hemoglobin tipleri (21).

Tipi	Yapısı	Özelliği
Hemoglobin A	$\alpha_2\beta_2$	Erişkin hemoglobininin %98'i
Hemoglobin A ₂	$\alpha_2\delta_2$	Erişkin hemoglobininin %2'si
Hemoglobin F	$\alpha_2\gamma_2$	Başlıca fetal hemoglobin
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embriyonik hemoglobinler
Hb Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	" "
Hb Portland I	$\zeta_2\gamma_2$	" "
Hb Portland II	$\zeta_2\beta_2$	" "



Şekil 1. Predominant hemoglobin tiplerinin gelişim süreci (110).

Hemoglobinin fizyolojik özellikleri eritropoietik hücrelerdeki subünitlerinin düzenli olarak biraraya gelmesine bağlıdır. α - ve β -globin polipeptid zincirlerinin biyosentezi normal olarak dengelenmektedir. Hem grubu translasyon sırasında ya da kısa süre sonra globin subünitlerine bağlanır. $\alpha\beta$ -dimerinin biçimlenmesi negatif yüklü β -subünitine pozitif yüklü α -subünitinin elektrostatik ilgisiyle kolaylaşmaktadır (14).

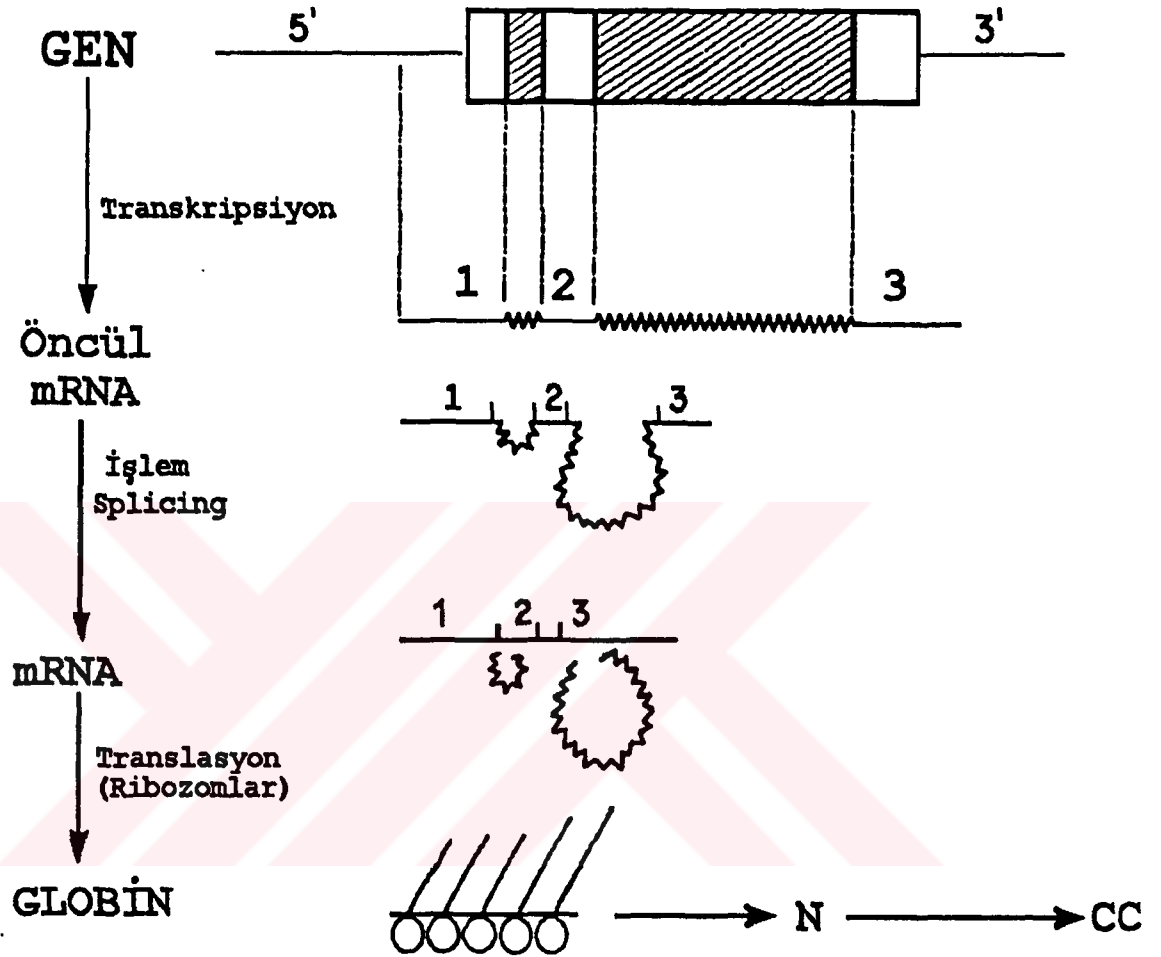
1.2. Globin sentezi:

Globin biyosentezi, ökaryotik hücrelerde DNA'dan RNA'ya, RNA'dan proteine genel bilgi aktarım yolunu kapsamaktadır. Globin genlerinin yapısı restriksiyon enzim analizi, klonlama ve dizi analizi ile tanımlanmıştır (Şekil 2)(110).

Globin genlerinin içinde ve yakınlarında gen fonksiyonu için önemli, korunmuş diziler bulunmaktadır. Bunlar promotor bölge, ekzon/intron sınırı ve mRNA kodlama dizisinin 3' indeki dizileri içermektedir. Globin genlerinin ekspresyonlarının başlıca düzenlenmesi transkripsiyonel düzeyde oluşmaktadır. Transkripsiyon sırasında ve sonrasında globin mRNA prekürsörleri olgun mRNA molekülüne başlıklanma, bağlanma (splicing) ve poliadenilasyon ile dönüştürülmektedir (57).

1.3. Globin gen yapısı:

İnsan globin genlerini içeren hücresel DNA'nın restriksiyon enzim analizi, klonlama ve dizi analizi tüm globin genlerinin yapısının ayrıntılı olarak tanımlanmasını sağlamıştır. β -benzeri genler olan ϵ -, γ -, δ - ve β -genleri iki intron ve üç ekzon içerir; küçük intron codon 30 ve 31 arasına, büyük intron ise codon 104 ve 105'ler arasına yerleşiktir. α ve ζ genlerinde intron 1 ve intron 2'nin yerleşimi farklıdır, bu genler non- α -genlerle karşılaştırıldığında codon sayısı 146'dan 141'e düşmüştür. Yapısal genin 3' terminalinde AATAAA dizisi içeren ekstra 75-100 nükleotide sahip translasyona uğramayan (kodlanmayan) bölge bulunmaktadır (57,71).

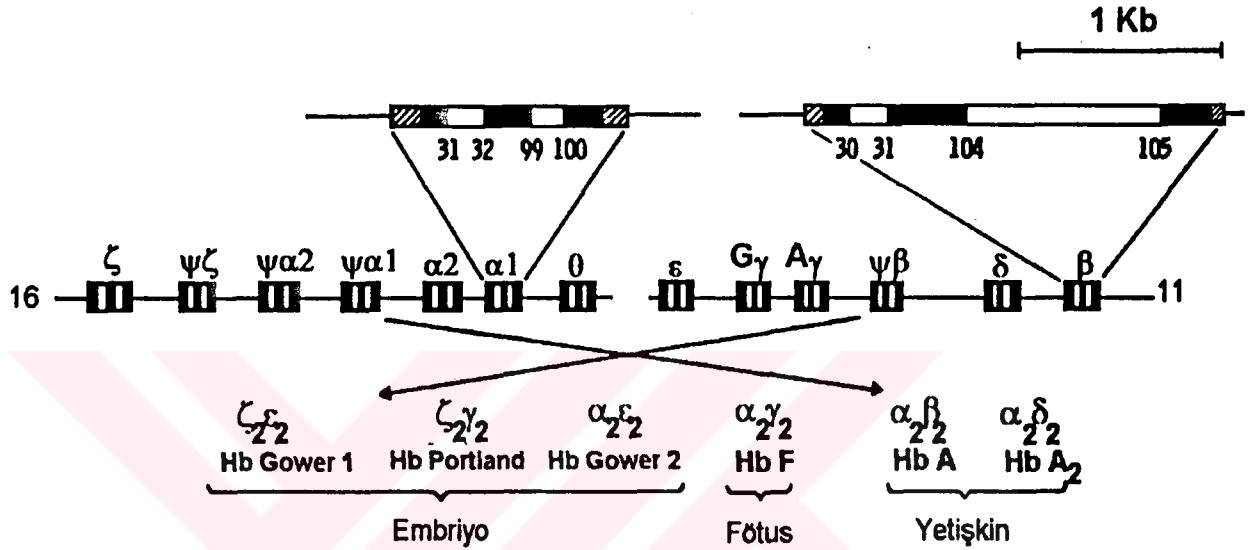


Şekil 2. Globin polipeptid zincirinin ökaryotik hücrede sentezi.

1.4. Globin genlerinin organizasyonu:

Globin genleri, kromozom 11 ve 16 üzerinde düzgün bir sırada organize olmaktadır. ϵ -, γ -, δ - ve β -genleri, 11. kromozomda DNA'nın bir tek parçası üzerinde

dizilmekte olup α -genleri de kromozom 16'da bir tek DNA fragmanı üzerinde bulunmaktadır (Şekil 3) (57).

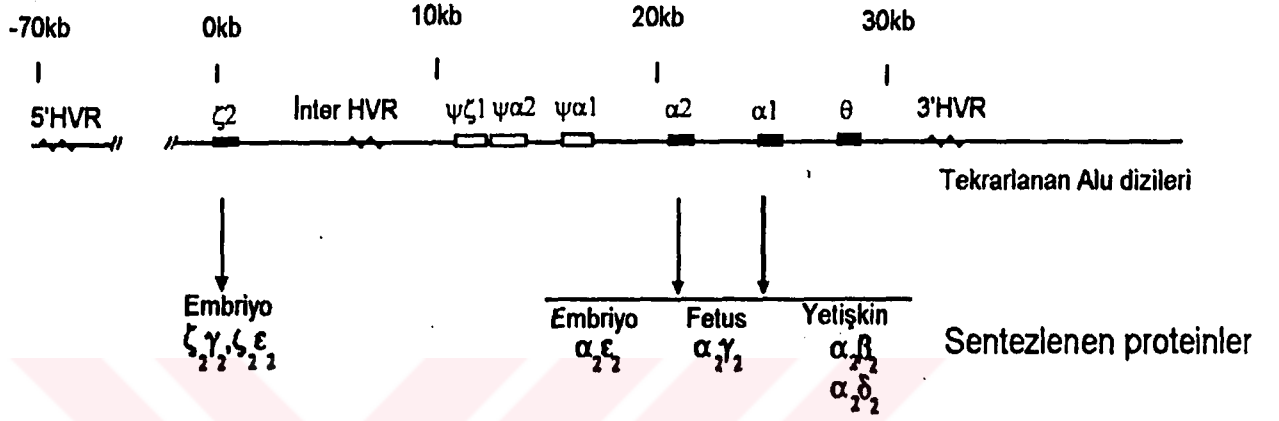


Şekil 3. α - ve β -Globin genlerinin gösterimi.

β -gen kompleksinde psödogen olarak adlandırılan bir gen vardır. Bu gen fonksiyonel olarak intakt globin geni için gerekli tüm yapısal özellikleri gösteren DNA baz dizisini içermez, fakat β -benzer genlerle önemli ölçüde nükleotid homolojisine sahiptir.

α -loküsün lokalizasyonu, bir çok yöntemle 16. kromozomun kısa kolunun distal segmentinde (p13.1-p ter) olduğu gösterilmiştir. 16p'nin genetik dizi haritası da bu lokalizasyonla ortaya çıkarılmıştır. 29 kb.lık bu bölge gen ve psödogenlerden oluşan 7 genlik bir küme içermektedir. α -globin gen kümesi, 5'- ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ -3' düzeninde

yerleşmiş olup, α -benzeri genleri iki alfa (α_2 ve α_1), bir embriyonik α -benzer genini (ζ), üç psödogen ($\psi\zeta, \psi\alpha_2, \psi\alpha_1$) ve fonksiyonu tam tanımlanmamış θ genini içermektedir (Şekil 4) (11,48,49,58).



Şekil 4. α -Globin gen kümesi.

α -Globin gen kümesinin birçok bölgesi DNA'nın birbiri ardına tekrarlayan dizilerini içermektedir. Bu özelliğe sahip 5 ayrı bölge vardır. Çok değişken özellik gösteren bu bölgeler (HVR), gen kompleksinin 3' ucunda (α -globin 3'-HVR), ζ_2 ve ζ_1 genleri arasında (interzeta-HVR), ζ benzer genlerin intronları içinde (ζ -intron HVR, 2 tane) ve ζ_2 -globin geninden 70 kb uzaklıkta 5' ucunda (α -globin 5'-HVR) yerleşmiştir. α -Globin gen kümesinin HVR bölgelerinin kısa, benzer görünüşte olduğu ve GC'den zengin dizilerin birbiri ardına dizilmesiyle oluştuğu tanımlanmıştır. Her dizideki tekrar sayısı, mitosis ve mayositteki dengesiz genetik değişimle ya da replikasyon sırasında DNA'nın kayması ile değişebilmektedir. Gen kümesinin yüksek poliformik segmentleri Southern Blot hibridizasyon yöntemi ile saptanabilmektedir. Her HVR loküsü mendeliyan biçimde kalıtılmaktadır (48,49,71).

1.5. α -Benzeri Globin Genlerinin Yapısı ve Salınımı:

α -Globin gen ailesi, bir seri gen duplikasyonu ve dizi ayrışması sayesinde gelişmiştir. Polipeptid yapılarında benzerlikler vardır. Fonksiyonel α - ve ζ -genlerinin 141 aminoasitlerinden yalnızca %58'inde homoloji gözlenmektedir. α_1 ve α_2 genleri ise oldukça homolog olup, yalnızca IVS 2'lerinde ve 3' kodlanmayan bölgelerinde farklılık gözlenmektedir. Genelde globin genleri iki tane kodlanmayan intervening sequence (IVS veya Intron) ile üç ekzona ayrılmaktadır. İki α -globin geninin protein ürünleri aynıdır. Yapılan çalışmalar, α_2 -globin mRNA'sının normal kişilerin retikülositlerinde α_1 -globin mRNA'sından 2.6 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu artışın transkripsiyonel orijinli olduğu sanılmaktadır. α_2 -mRNA predominansı, α_2 -geninin α -globin yapımında baskın rol oynadığını düşündürmektedir (48,49,58,71). Normal bireylerde α_2 - ve α_1 -mRNA oranı 2.6:1 iken heterozigot α -talasemi-2'lilerde 2:1 olmaktadır. α -Globin varyantlarında RT/PCR (revers transkripsiyon/PCR) yöntemi ile yapılan çalışmalarda ise protein düzeyinde $\alpha_2:\alpha_1$ oranı 1.19:1 olarak bildirilmektedir. Bu durum, α_2 -mRNA'nın daha düşük etkinlikte translasyona sahip olduğunu göstermektedir (79).

α -Globin gen kümesindeki 150 bp.lik bir dizi transkripte olmamakta, fakat transkripsiyon için promotor ve regülatör görevi gören önemli oligonükleotid kutularını (CAT ve ATA kutuları gibi) içermektedir. CAP bölgesi ile başlayan ve ATG kodonu ile sonlanan 40 bp.lik bir dizi transkripte olmakta, fakat translasyona uğramamaktadır. Birinci ekzon 93 bp olup α -globin zincirinin 31 aminoasitlik kısmını kodlamaktadır. İlk intron (IVS-1) 117 bp olup mRNA işlenmesi sırasında ayrılmaktadır. Ekzon 2, 201 bp uzunluğundadır ve 32 den 99'a kadarki aminoasitleri kodlamaktadır. IVS-2, α_1 -geninde 149 ve α_2 -geninde 141 bp uzunluğundadır ve mRNA olgunlaşması sırasında ayrılmaktadır. Ekzon 3, 126 bp olup 101-141 arası aminoasitleri kodlar. Globin sentezini sonlandırma kodonu (TAA) 3 bp.dir. Translasyona uğramayan 110 bp.lik bir dizi

prekürsor mRNA'nın ayrılma sinyalini veren ve poli A kuyruğunu ekleyen AATAAA dizisi ile 3' ucunu kapatır; Poli A kuyruğu sitoplazmada işlenmiş mRNA'nın stabil geçişi ve fonksiyonu için esansiyeldir (76).

α -Globin gen kümesinin transkripsiyonal aktivasyonu, bu kümenin 5' ucuna yerleşik loküs kontrol bölgelerinin (LCR) varlığına ve etkinliğine bağlıdır. α -Globin LCR, iki başlıca eritroid spesifik ve bir çok DNase I aşırıduyarlı bölge içerir. α -Globin ekspresyonu için gerekli olan LCR'daki tüm önemli düzenleyici diziler, α -globin gen kümesinin 5' ucundaki 30-50 kb.lar arasında yerleşmiş durumdadır. LCR bölgesini içeren bir delesyon α -globin genleri intakt olmasına karşın α -talasemiye yol açmaktadır (89).

mRNA düzeyinde yapılan çalışmalar ζ -globin mRNA'sının erişkinde çok düşük değerlere sahip olduğunu göstermektedir. Fonksiyonel α -globin sayısı ile ζ -globin mRNA'sı arasında tersine bir ilişki vardır (73).

2. α -Talasemiler:

2.1. α -Talasemideki Moleküler Defektler:

α -Talasemi, α -globin gen sentezindeki bir yetersizlik sonucunda oluşan biyokimyasal defekte bağlıdır. Bu durum sıklıkla α -globin gen ekspresyonundaki bir kalıtsal defektle oluşmakta veya kazanılmış olarak ta gelişebilmektedir. α -Talasemiler, en çok delesyonlarla veya bunun yanında oldukça değişken mutasyon tipleri ile oluşmaktadır. α -Talasemi, α -globin geninin birinin ya da ikisinin delesyonu sonucu gerçekleşir (29,48,71).

α -Talaseminin iki tipi tanımlanmıştır. Bunlardan biri α -talasemi-1, diğeri klinik ve hematolojik bulguları belirgin olmayan α -talasemi-2'dir. α -Talasemi-1'de, α -globin sentezi tamamen yoktur, α -talasemi-2'de ise sentezde azalma vardır. Son zamanlarda α^0 -talasemi ve α^+ -talasemi olarak ta tanımlanmaktadır. α^0 -Talasemi, her iki α -globin genini içeren bir delesyon sonucu oluşur. Eğer normal haplotip $\alpha\alpha$ olarak tanımlanırsa α^0 -talasemi haplotipi (-) olarak gösterilebilir. Bazı α^+ -talasemiler, iki α -globin geninin

birinin delesyonu sonucu gelişir ($-\alpha$), diğer bir kısmı da α -gen ekspresyonuna sınırlı ($\alpha\alpha^T$) nondelesyon mutasyonu sonucu gelişir. α^o ve α^+ determinantlarına ek olarak, α -globin yapısal varyantları, globin zincirinin sentez ve instabilite oranının azalmasına bağlı olarak α^+ -talasemi fenotiplerini geliştirebilir. Bu varyantların en sık gözlenenini Hb Constant Spring ve Hb Koya Dora'dır (77).

α -Globin genlerindeki delesyonla birlikte ζ -globin mRNA ekspresyonunda bir artış gözlenmektedir. Normal bireylerde düşük ζ -globin mRNA düzeyleri görülürken α -talasemi-1, α -talasemi-2 ve Hb H hastalığında ζ/α -mRNA oranı yükselmektedir. α -Talasemi-1 ve Hb H hastalığındaki ζ/α -mRNA oran artışı daha belirgindir. Bundan α -globin gen kümesinde bulunan LCR- ζ -globin gen kısmı sorumlu tutulmaktadır. LCR- ζ -globin gen yapısı ζ -globin geninin 3' ucunda 2 kb.lık DNA dizisi içermektedir (73,103).

2.2. α -Talasemi-1:

α -Talasemi-1'ler, $(\alpha\alpha)^{RA}$ delesyonu hariç, α -globin genlerinin her ikisindeki tam ya da kısmi delesyonları tanımlamaktadır. α -Talasemi-1 olgularında fonksiyonel α -globin genlerinin her ikisi delesyona uğramakta ve etkilenen kromozomdan α -zincir üretimi ortadan kalkmaktadır. Bu tip kromozomların homozigotluğu Hb Barts hidrops fetalis sendromuna neden olmaktadır (29,48,76).

Birçok delesyon iki α -geni ve ζ -globin genini ortadan kaldırmakta, fakat bu varyantlardaki heterozigotlar yaşamlarını sürdürmekte ve gelişimlerini normal olarak tamamlamaktadırlar. Homozigotlarda ne embriyonik ($\zeta_2\epsilon_2$, $\alpha_2\epsilon_2$, $\zeta_2\gamma_2$) ne de fetal ($\alpha_2\gamma_2$) hemoglobinler yapılamadığından gebeliğin erken dönemlerinde bile yaşayabilmeleri olası değildir. Embriyonik gen kalıntıları intakt olan delesyonların bazıları yetişkin yaşamda küçük miktarlarda ζ -globinin ekspresyonuna eşlik etmektedir (48,71).

62 kb uzunluğunda bir delesyonun neden olduğu α -talasemide $[(\alpha\alpha)^{RA}]$ delesyonun altında kalan ve transkripsiyon birimini oluşturan α -globin genleri delesyona uğramamaktadır. Buna karşın α -talasemi tablosunun ortaya çıkması bir regülatör dizinin varlığını akla getirmektedir (46,48).

($-\text{MED}^I$), ($-\text{MED}^{II}$), ($-(\alpha)^{20.5}$), ($-\text{SPAN}$), ($-\text{CANT}$) ve ($-(\alpha)^{5.2}$) delesyonları Akdenizli popülasyonlarda gösterilmiştir (11,69). ($-\text{MED}^I$)'de delesyon $\psi\zeta$ -geninin 5' ucundan her iki α -globin genini içerecek şekilde uzanmaktadır. ($-\text{MED}^{II}$) delesyonu 26.5 kb uzunluğunda olup ζ -, $\psi\zeta$ -, $\psi\alpha$ -, α_2 - ve α_1 -genlerini içermektedir. [$-(\alpha)^{20.5}$] delesyonu, $\psi\zeta$ -, $\psi\alpha$ -, α_2 -genlerini ve α_1 -geninin ilk 5 kodonunu içermektedir. ($-\text{SPAN}$) delesyonu, $\psi\alpha_1$ -geninin 3' ucundan başlayarak α_1 - ve θ -genini de içerecek şekilde uzanmaktadır (71). İspanya'da 22 kb uzunluğunda olan ve $\psi\alpha$ -, α_2 - ve α_1 -genlerini kapsayan bir delesyon tanımlanmıştır. Delesyonu taşıyan kromozom üzerinde ζ -globin triplikasyonunu taşımaktadır (37). [$-(\alpha)^{5.2}$] delesyonu, α_2 -geni ve α_1 -geninin 5' parçasını kapsamaktadır (48). ($-\text{CANT}$) delesyonu 14-15.4 kb uzunluğunda ve $\psi\alpha$ -, α_2 -, α_1 - ve θ -genlerini içermektedir (108). ($-\text{YEM}$) delesyonu yeni tanımlanmış olup 39 kb uzunluğunda ve $\psi\zeta$ -, $\psi\alpha$ -, α_2 -, α_1 - ve θ -genlerini kapsadığı ileri sürülmektedir (94). Diğer delesyonların uzunlukları ve yerleri şekil 5'te gösterilmiştir.

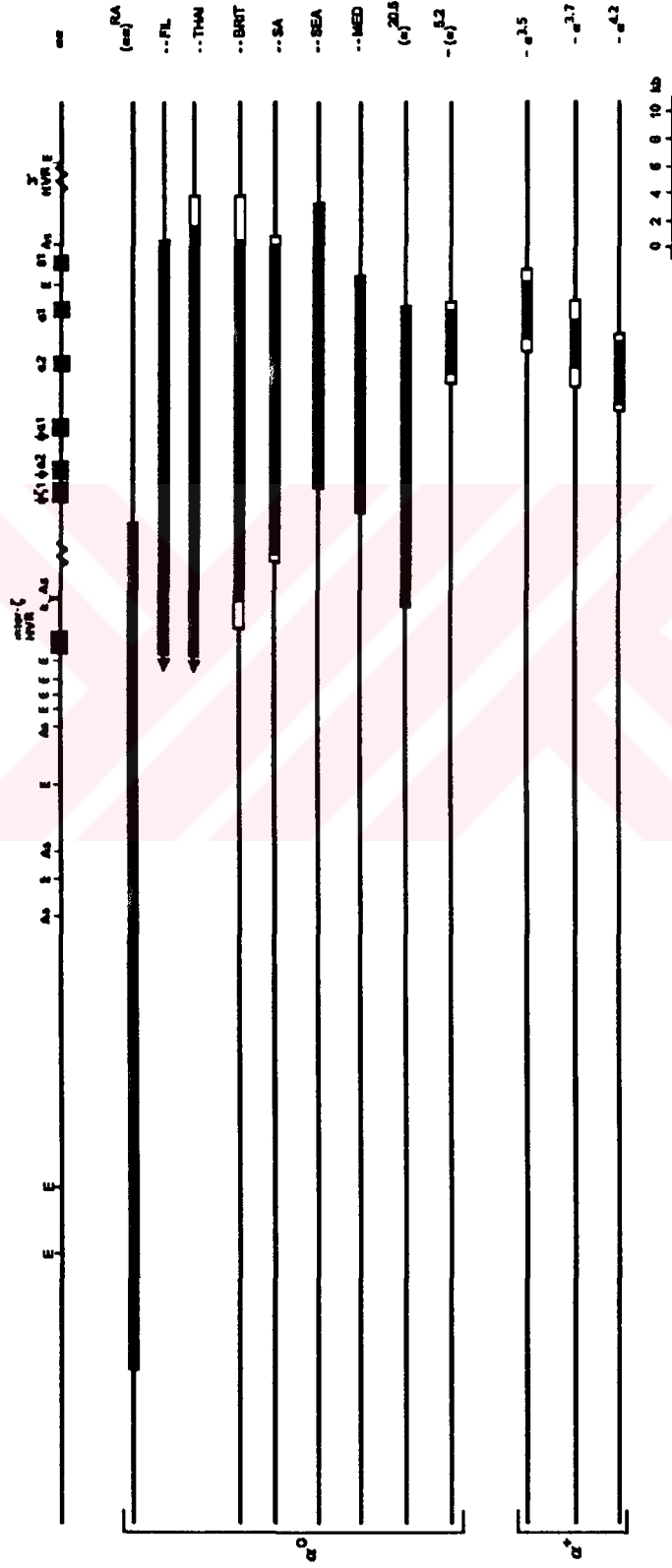
2.3. α -Talasemi-2:

Alfa talasemilerin iki α -globin geninden birini içeren delesyon nedeniyle oluşan şekli dünyada oldukça sık görülür. En yaygın gözlenen iki tipi vardır; bunlardan ilk sırada gözlenen 3.7 kb DNA kaybıdır ve daha az oranda gözlenen ise 4.2 kb DNA kaybı sonucu oluşur, sırasıyla $-\alpha^{3.7}$ ve $\alpha^{4.2}$ delesyonu olarak tanımlanır. $-\alpha^{3.7}$ delesyon tipi daha sık olmakla beraber her ikisi tek bir popülasyonda yaygın olarak görülebilmektedir (9,29,48,71,76,101).

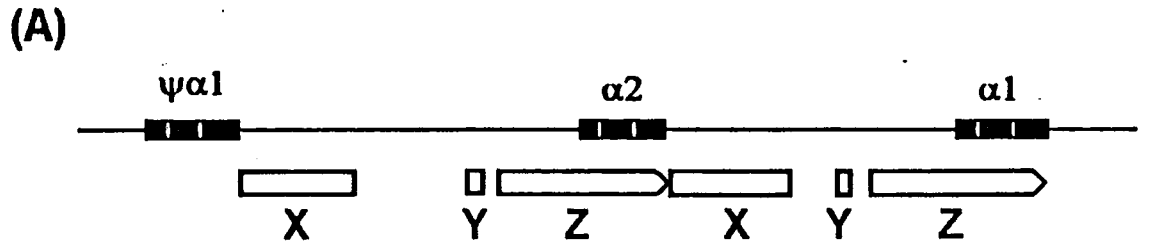
α -Talasemi-2 nedeni olan delesyonlar, α -globin kümesindeki homolog rekombinasyon sonucu görülür. α -Globin genleri, geniş bir homolog bölgeye yerleşmiştir, bu bölgede X, Y ve Z olarak birbirinden ayrı homolog subsegmentler bulunmaktadır. Oluşan rekombinasyon mayotik ya da mitotiktir. 4.2 kb ve 3.7 kb delesyonları sonucunda iki X ya da iki Z bölgeleri arasında crossover oluşabilir (Şekil 6) (9,48). Bu crossoverlerin oluşturduğu göreceli pozisyonlardan dolayı $-\alpha^{3.7}$ sağ taraftaki delesyonları ve $-\alpha^{4.2}$ sol taraftaki delesyonları göstermektedir. 3.7 kb uzunluktaki Z segmentleri arası resiprokal rekombinasyon α -talasemiye neden olan yalnızca bir α -

genli kromozomu ve üç α -genli diğeri ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$) oluşturur. 4.2 kb uzunluktaki X segmentleri arasındaki rekombinasyon bir α -talasemi belimesine neden olan tek α -genli kromozomu ve bir $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 4.2}$ kromozomunu verir. $-\alpha$ ve $\alpha\alpha\alpha$ kromozomları çoğu popülasyonlarda görülmektedir (82). $-\alpha$ Delesyonel formları çok farklı Hb varyantları, HVR allelleri ve α -globin haplotipleri ile ilişkili olarak bulunmaktadır (48,57,71). Güneydoğu Asya ülkelerinde bir kromozomda üç ζ -globin geni ($\zeta\zeta\zeta\alpha\alpha/\zeta\zeta\alpha\alpha$) bulunan ζ -globin gen varyantı tanımlanmıştır (86,107).

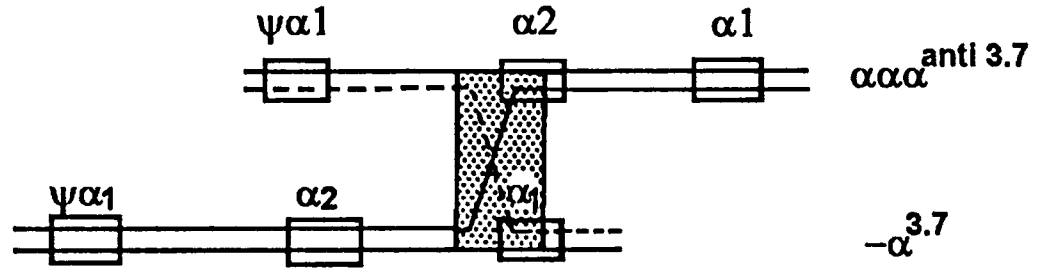
$-\alpha^{3.7}$ delesyonunun tip I formu, iki α -globin geninin 863 nükleotidlik 5' ucundan ikinci intronun 7 baz insersiyon/delesyon diverjansına kadar uzanan çok geniş bir bölgede oluşur. Bu en sık görülen formdur. Tip II ve III crossoverler ikinci intron ile üçüncü ekzonda translasyona uğramayan bölgedeki poli A kuyruğu ile çevrili homolog segmentin diverjans segmentine kadar uzanan bölgede oluşur. $-\alpha^{3.7}$ 'nin I, II ve III tipleri PCR'i temel alan restriksiyon enzim haritalaması ile ortaya çıkarılmaktadır (24,25,48). Tip I Akdenizi çevreleyen ülkelerde, II rast gele dağılmış olarak ve III Malezya ve Polinezya çevresinde görülmektedir (83).



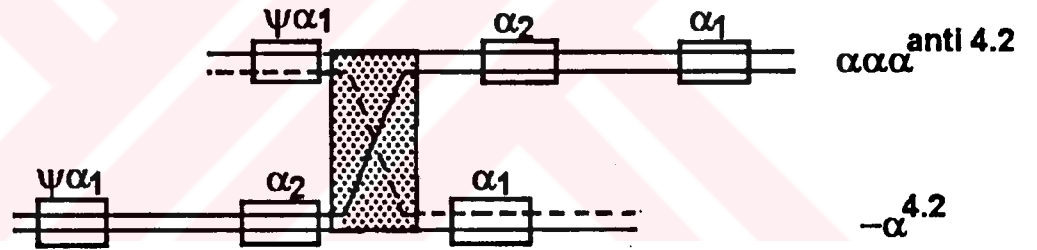
Şekil 5.α-Talasemi-1'e neden olan delesyon tipleri.



(B) Sağa doğru crossover



(C) Sola doğru crossover



Şekil 6. α -Talasemi-2'ye neden olan cross-over (48,110)

α -Talasemi-2'ye neden olan diğer delesyonlar da 3.5 kb DNA kaybı ile oluşan $-\alpha^{3.5}$ ve 2.7 kb DNA kaybı ile olan $-\alpha^{2.7}$ talasemi tipleridir (118). $-\alpha^{3.5}$ tipinde α_1 -globin geni delesyona uğramakta α_2 -loküsü intakt kalmaktadır.(9).

2.4. Nondelesyon α -Talasemi:

α_2 -Geninin ekspresyonu, α_1 -geninden 2.6 kat daha fazla olduğundan çoğu nondelesyonel mutantların α_2 -gen ekspresyonunda daha baskın olmaktadır. β -talasemi mutasyonları gibi α -talasemi mutasyonları da etkiledikleri gen ekspresyonu düzeyine göre sınıflandırılabilir. İki tane RNA işlem mutasyonu tanımlanmıştır. İlki, α_2 -globin geninin IVS-1'inin 5' splice bölgesini içeren beş nükleotidlik delesyonu içermektedir. Bu, α_2 -genini tam olarak inaktive etmektedir (48,71). İkinci mutant tipi, Ortadoğu'da sık olup poli-A kuyruğu sinyal bölgesini (AATAAA \rightarrow AATAAG) içermektedir (30,48,76). Poliadenilasyon bölgesinde tanımlanan ve α -talasemiye neden olan iki mutasyon daha vardır. Bunlardan biri Türk kökenlilerde bulunan AATAAA \rightarrow AATGAA mutasyonudur (116). Diğeri ise Hint kökenlilerde gösterilen α^{PA-2} (AATAAA \rightarrow AATA $_$) mutasyonudur (45). α -Globin geninde IVS-1-117 (G \rightarrow A) alıcı splice yeri mutasyonu nondelesyonel α -talasemi-2'ye neden olmaktadır. α -Talasemi-2 ile bu mutasyonun birlikte bulunması durumunda, α -globin zinciri homozigot α -talasemi-2 gibi davranmaktadır (22,48).

α_2 -Globin geninin codon 29'undaki bir baz substitüsyonu α -talasemiye neden olmaktadır. α_2 -Globin geni codon 29 da T \rightarrow C substitüsyonu $\alpha^{29Leu\rightarrow Pro}$ varyantını yaratmaktadır. $\alpha^{29Leu\rightarrow Pro}$ varyantı artmış instabilitesi ve hızlı katabolizması nedeniyle α -talasemi ile sonuçlanmaktadır. α -Talasemi-1 ile bileşik kalıtımla ortaya çıkan Hb H hastalığı ciddi hipokromik mikrositer bir anemiye yol açmaktadır (44).

Sonlandırma kodonundaki mutasyonlara bağlı gelişen α -talaseminin nondelesyon tipleri de bulunmaktadır. Posttranslasyonel dengesizlik sonucu α_2 ya da α_1 -genlerinde exon III'e sınırlı mutasyonlar da nondelesyonel α -talasemiye neden olmaktadır. Henüz yapısı tam olarak bilinmeyen bazı nondelesyon mutantları da vardır (48).

Hb Constant Spring, α_2 -globin geninde bir mutasyon (TAA \rightarrow CAA) sonucu α -globin zincirinin 141 aminoasit yerine 172 aminoasit içermesi ile oluşmaktadır. Daha kısa zincirli (154 ve 164 aminoasitli) α -globin zincirlerinin proteoliz sonucu kısaltıldığı

düşünülmektedir. α -Talasemi taşıyıcısı gibi davranmakta ve ağır fenotipe yol açmamaktadır (Tablo 2) (64,71,78).

Nondelesyon α -talaseminin ikinci bir grubu mRNA translasyonu ile interfere mutasyonlarla sonuçlanmaktadır. Bir olguda başlama kodonu bir T→C transizyonu ile inaktive olmakta ve diğer birinde başlama etkinliği, başlama sinyali çevresindeki ortak dizide bir dinükleotid delesyonu ile azalmaktadır (48).

3. α -Talasemilerin Klinik Tablosu:

α -Geninin 30'dan çok haplotipi bilinmekte ve bu yüzden 465'in üzerinde etkileşim ortaya çıkmaktadır. Fenotipik olarak bu sonuçlar dört kategoride incelenebilir, bunlar, sessiz taşıyıcılık (üç fonksiyonel α -geni), α -talasemi trait (iki fonksiyonel α -geni), hemoglobin H hastalığı (bir fonksiyonel α -geni) ve hemoglobin Barts hidrops fetalis veya α^0 -talasemi (fonksiyonel α -geni olmaması) olarak sınıflandırılabilir. Fonksiyonel α -globin genlerinin dörtten başlayarak sıfıra kadar düşmesi gibi, retikülositlerde α/β globin yapım oranı normal değeri olan 1'den başlayarak sırasıyla 0.8, 0.6, 0.3 ve 0'a kadar azalmaktadır. Alfa dışı globin yapımı fetal ve postnatal yaşamda sürdüğünden alfa dışı zincirler (γ ve β) çok miktarda yapılmaktadır (Tablo 3)(58) . Klinik olarak anlamlı α -talasemi tanısı %2'den fazla Hb Barts varlığında düşünülmektedir. α -Zincir yapımının azalmasıyla oluşan globin zincir sentezindeki dengesizlik, alfa dışı zincirlerin baskın olduğu γ -globin tetramerinden oluşan Hb Bartsın artışıyla sonuçlanmaktadır (75).

α -Talasemilerin tanısı için çeşitli hematolojik verilerin yanı sıra moleküler niteliğini ortaya çıkarmak için kullanılan yöntemler vardır. Kullanılan moleküler yöntemler gen haritalama, restriksiyon enzim analizi, klonlama, PCR ile radyoizotopa bağımlı olmayan teknikler ve DNA dizi analizi şeklinde sayılabilmektedir. DNA dizi analizi, mutasyonları ortaya çıkarmada kullanılmaktadır (81).

Tablo 2. Uzamış polipeptid zincirli hemoglobinler (51).

Hb Adı	Rezidüler
α 141 (H19)	141 <u>142</u> 143 144 145 146 147 148 149 150
<u>Constant Spring</u> (31 ek rezidü)	Arg-GLN-Ala-Gly-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Pro- 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 Pro-Ala-Arg-Trp-Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu- 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 Leu-Pro-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Phe-Leu-Val- 171 172 Phe-Glu-COOH
α 141(H19) <u>Icaria</u>	<u>142-LYS</u> dışında Hb Constant Spring ile aynıdır.
α 141(H19) <u>Koya Dora</u>	<u>142-SER</u> dışında Hb Constant Spring ile aynıdır
α 141(H19) <u>Seal Rock</u>	<u>142-GLU</u> dışında Hb Constant Spring ile aynıdır
<u>Frameshiftler</u>	139 140 141 142 143 144 145 146
α 139(HC1) <u>Wayne</u>	<u>ASN</u> -Thr-Val-Lys-Leu-Glu-Pro-Arg-COOH
<u>Ekstensiyonlar</u>	-1 +1 +2
α 1(NA1) <u>Thionville</u>	<u>MET-GLU</u> -Leu-Ser

Tablo 3. Alfa talasemilerin klinik özellikleri (13,99)

Olası Fenotip	Genotip	MCV	MCH	Hb A ₂	%Hb H/Barts
Normal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N	N	N	-
Sessiz taşıyıcı	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	N	N	N,↓	0
α -talasemi trait	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ $-\alpha\alpha$ $-\alpha/\alpha^T\alpha$ $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{3.7}$	N,↓	N,↓	N,↓	0
Hb H hastalığı	$-\alpha^{3.7}$ $-\alpha^{4.2}$ $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ $-\alpha^{CS}\alpha$ $-\alpha^T/\alpha^T$ $-\alpha^T\alpha$	↓	↓	N,↓	2-10 Hb H
Hb Barts hidrops	$-/-$	↓	↓	-	80 Hb Barts

MCV değerleri yetişkin değerlerini göstermektedir. N, Normal; α^T , nondelesyonel α -talasemi; --, kromozomdan iki α -geninin kaybı.

Delesyonel α -talasemi tanısında kullanılan immunositolojik testler taşıyıcıları bulmada kullanılan yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip testlerdir. Güneydoğu Asya kaynaklı yayınlarda α -talasemi-1 tanısında başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir (102,103).

Homozigot α -talasemi-1 tablosunun yol açtığı Hb Barts hidrops fetalis sendromlu olgulara gebeliğin ilk trimesterinde prenatal moleküler tanı işlemi yapılabilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek yöntemlerin

kullanıldığını bildiren yayınlar vardır. %5'ten az bir maternal kontaminasyonun fetal tanıyı önemli derecede etkilemediği bildirilmektedir. Güneydoğu Asya ülkelerinde özellikle $-\alpha^{SEA}$ homozigotluğu söz konusu olduğundan bu yöntem rutin olarak kullanılmaktadır (10,60,62,67,69,74,114). Güneydoğu Asya kökenliler yanında Akdeniz'lilerde de prenatal tanı oldukça önemlidir (87).

α -Talasemili bazı olgularda mental retardasyonun da birlikte görüldüğü bildirilmektedir. α -Talasemi/mental retardasyon sendromlu olgularda dismorfik bozukluklar ve orta derecede bir zeka geriliği görülmektedir. Bazı olgularda 16. kromozomun kısa kolunda 5'HVR ve 3'HVR bölgelerini içeren de novo delesyon bulunmaktadır. 16. kromozomdaki delesyon sonucu olan sendroma ATR-16 sendromu adı verilmektedir (48,68,71,113). İkinci bir grupta, 16. kromozomda α -globin geninde bir anomali saptanmamaktadır. ATR-16'nın klinik özellikleri değişkendir. İkinci grupta yapılan çalışmalar kalıtımın bir X-geçişli resesif bozukluk sonucu oluştuğunu göstermektedir. Bu sendrom da ATR-X sendromu olarak adlandırılmaktadır. X-kromozomu çalışmaları hastalığın Xq12-q21.31 bölgeleri aralığında yerleştiğini göstermektedir. ATR-X sendromunda anomaliyi oluşturan yapı bilinmemektedir (36).

3.1. Sessiz Taşıyıcılık

Tek bir α -globin geninin delesyonu, fenotipik olarak sessizdir. Sessiz taşıyıcıların fenotipini, normalden ayırmak daima zor olmaktadır. Ortalama eritrosit hacmi (MCV) 78-80 fL arasında ve ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) de sınırda veya düşük olabilmektedir. Tüm diğer hematolojik parametreler normaldir (71).

$-\alpha^{3.7}$ delesyonu dünyadaki en yaygın tek gen bozukluğudur. Amerikalı siyahların yaklaşık %30'u sessiz taşıyıcıdır ve iki kromozomlarından biri normal olup diğerinde tek fonksiyonel α -geni taşımaktadırlar, sessiz taşıyıcılık Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Hindistan, Güneydoğu Asya ülkeleri, Endonezya, Amerika kıtası ülkeleri ve Güney Pasifik adalarında siktir (9,10,58,98,101).

3.2. α -Talasemi Trait

α -Talasemi traitde iki α -globin geninin kaybı ve fonksiyonel iki α -globin geninin korunması ile ortaya çıkan klinik bir durumdur. α -Talasemi trait'in en sık nedeni $-\alpha^{3.7}$ delesyonuna homozigotluğudur ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). İkinci olarak daha az sıklıkta $-/\alpha\alpha$ genotipi de bu fenotip altında yer alabilir. Bu genotip, genellikle anlamlı bir mikrositoz, artmış kırmızı hücre sayısı ve hissedilebilir bir α/β sentez oranında dengesizlikle ilişkilidir. $-\alpha^{4.2}$ delesyonu homozigotluğu, $-\alpha^{3.7}$ delesyonu homozigotluğundan daha belirgin bir fenotipe sahiptir. $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ bileşik heterozigotluğu arada bir fenotip şiddetine sahiptir. $-\alpha^{3.7}$ delesyonunun daha hafif fenotipi, belki geriye kalan α -globin geninin ekspresyonundaki karşılayıcı artışın bir yansımasıyla olmaktadır. $-\alpha^{4.2}$ delesyonunda bu durum oluşmamaktadır (71).

α -Talasemi-1 trait, doğumda %5-15 oranında hemoglobin Barts varlığıyla tanımlanmaktadır. Bu hemoglobin maturasyon sırasında ortadan kalkmakta ve aynı miktarda hemoglobin H ile yer değiştirmektedir. Ara sıra hemoglobin H inklüzyon cisimcikli hücre, brillant cresyl mavisi ile inkübasyon sonrası görülebilmektedir. Bu fenomen sıklıkla α -talasemi trait için tanısal bir test olarak kullanılmaktadır. Yetişkinde artmış kırmızı hücreler, düşük MCH ve MCV değerleri ile heterozigotik talaseminin morfolojik değişikliklerine sahiptir (71).

Hemoglobinin elektroforetik görünümü normaldir ve hemoglobin H gözlenmemektedir. Globin sentez çalışmaları, α/β zincir yapım oranının yaklaşık 0.7 oluşu ile α -globin zincir yapım eksikliğini göstermektedir. α -Talasemi-2 trait bazı olgularda doğumda %1-2 hemoglobin Barts gibi minimal hematolojik değişikliklerle tanımlanmaktadır. α/β zincir yapım oranı, yaklaşık 0.8 gibi hafifçe düşmektedir (77).

3.3. Hemoglobin H Hastalığı

Hemoglobin H hastalığı, yaşamla bağdaşabilen α -talasemi fenotiplerinin en ciddisidir. Hemoglobin H hastalığına yol açan en sık genotip, bir tek fonksiyonel α -globin genini içeren $-/\alpha$ durumudur. α -Talasemi-1 ve α -talasemi-2 genlerinin birarada oluşu

Hb H hastalığının genotiplerinden biridir (11,48,71,74,91). Yalnızca delesyonlarla oluşan biçimi yanı sıra, daha az sıklıkla görülen diğer hemoglobin H genotipleri, delesyonel ve nondelesyonel defektlerin birlikte kalıtımını ($-/-\alpha^T$) ve nondelesyonel defektlerin homozigotluğunu ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$ veya $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$) kapsamaktadır (7,30,34,48,71,74).

Hemoglobin H hastalığının genetik temelindeki heterojenlik, klinik şiddeti ile ilişkili olarak gözlenmektedir. Hemoglobin H hastalığının sık görülen delesyonel formu ($-/-\alpha$), nadiren belirti vericidir. α -Talasemi-1 ile birarada olup Hb H hastalığına neden olan delesyonel α -talasemi-2 tiplerinin özelliği hematolojik verilerde etkili olmaktadır. Bir α -talasemi-1 ile $-\alpha^{3.7}$ tipi α -talasemi-2'nin birlikte neden olduğu Hb H hastalığına ait hematolojik veriler, $-\alpha^{4.2}$ tipi ile olandan daha ılımlı sonuçlar vermektedir (31). Nondelesyonel olgulardaki hematolojik veriler delesyonel olgulardan daha yüksek MCV ve Hb H düzeyi ile daha düşük Hb düzeyini göstermektedir (16,30,74). α_1 -Globin geninin nondelesyonel bir mutasyonla kaybı genelde oldukça hafif bir klinik tabloya yol açmaktadır. α_2 -Globin geninin nondelesyonel bir defektle kaybı, delesyonla kayıp ($-/-\alpha$) ve α_1 -globin geninin nondelesyonel bir mutasyonla kaybından ($-/-\alpha^T$) çok daha ciddi bir fenotiple sonuçlanmaktadır (34). Nondelesyonel defektler kromozomlarda tek gen delesyonu ile birlikte de yerleşebilmektedir. Hemoglobin H hastalığının az görülen nedenlerinden biri de $-\alpha/-\alpha^T$ genotipidir (71). Genotipi $-\alpha^{4.2}\alpha/\alpha^T\alpha$ veya $\alpha^{4.2}\alpha/\alpha\alpha^T$ olan ve Hb H hastalığı fenotipini gösteren olguların varlığı bildirilmektedir. Fenotipin kliniği mutasyonun olduğu α -globin genine bağlı olarak α_2 -globin geni lehine ağır olmaktadır (91).

Hemoglobin H hastalığı fenotipi, mikrositoz, 9-12 gr/dl arasında hemoglobin düzeyine sahip hafiften orta şiddete kadar varan anemi ve splenomegaliyi kapsamaktadır. Değişken nitelikte bir splenomegali ve kemik değişiklikleri ile birlikte olan uzun süreli bir anemi vardır. Eritrosit morfolojisi genellikle bazofilik noktalanma, target hüceleri ve gözyaşı damlası şekilleri ile anormaldir. Kan tablosunda eritrositlerde hipokromi ve anizopoikilositoz gözlenmektedir (71).

Hb H hastalığının çarpıcı klinik özelliklerinden biri yüksek ateş oluşumu sırasında hemoglobin konsantrasyonunun ani düşmesidir. Bu olay hemolitik kriz olarak bilinmektedir. Hemoglobin H (β_4) anstabil, çökelir ve eritrositler brilliant cresyl blue

veya methylene blue gibi bazik boyalarla inkübe edildiğinde eritrosit içi inklüzyon cisimcikleri şeklinde yapışır. Enfeksiyonun ateşli devresi sırasında inklüzyon cisimciklerinin oluşum mekanizması açık değildir. Enfeksiyonla aktiveleşen fagositik hücrelerde yapılan serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksidin anstabil hemoglobini denature edebileceği ileri sürülmektedir (19).

Eritrositlerin brilliant cresyl mavisi boyası ile inkübasyonu sonucu çok sayıda küçük noktasal inklüzyonlar şeklinde hemoglobin H presipitatları görülmektedir. Splenektomi sonrasında büyük tek inklüzyonlar olarak görünmektedirler. Inklüzyon cisimcikleri, boyanın redox etkisinin bir sonucu olarak hemoglobin H'in in vitro presipitasyonu ile oluşmaktadır (97). Duyarlılığı ve özgünlüğü (sensitivite ve spesifite) daha yüksek olan %2 metilen blue boyaması ile inklüzyonlar gösterilebilmektedir. Talasemili eritrositlerin hipotonik çözeltilere dirençliliğinden yararlanılarak yapılan ozmotik frajilite testi de tanı amaçlı kullanılan bir testtir (72).

Hemoglobin H hastalığındaki anemi, Hb A'daki bir yetersizlikten ve değişken yapıdaki Hb H homotetramerlerinin düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Hemoglobin H presipitatlarını içeren eritrositlerin prematür nakli baskın olarak dalakta oluşmaktadır. Bu nedenle splenektomi hemoliz hızını azaltmada ve belirtileri iyileştirmede tedavi edici olabilmektedir (110).

α_2 -Globin geni terminasyon kısmındaki bir mutasyonla stabilitesi düşük, uzun α -zincirinin neden olduğu Hb Constant Spring, α -talasemi-1 ile birlikte ciddi ve transfüzyona bağımlı Hb H hastalığına yol açmaktadır. Geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Güneydoğu Asya'da bu olguların doğum öncesi tanısı konulabilmektedir (61,64,70,74,78).

Ciddi derecede etkilenmiş α - ve β -talasemik eritrositler ve onların ayrıştırılmış membranları normalden çok daha kırılgandır. β -Talasemik membranlar normalden daha az stabildir ve kolaylıkla parçalanabilirken α -talasemik membranlar normalden daha stabildir. Hb H hastalarında bu farklılıklara ek olarak eritrositler iyi hidrate durumdadır. Hb H hastalarında spectrinin talasemik eritrositlerde ters yüz keselere (inside-out vesicles; IOV) bağlanma anomallikleri görülmektedir. Spektrindeki anomallik iskelet protein ilişkilerini değiştirmekte ve belki bu da, Hb H hastalığında görülen membran hiperstabilitesinin nedenini göstermektedir (4,93,95,96).

3.4. Hemoglobin Barts Hidrops Fetalis

Dört alfa globin geninin tamamının kaybı yaşamla bağdaşmamakta, orta ya da geç gestasyonel dönemde hidropik fetusun ölü doğumu ile sonuçlanmaktadır. Hb Barts hydrops fetalis, tüm hidrops fetalis olgularının 1:10'unun nedeni olarak gözlenmektedir (56). Bu sendrom hemen daima delesyonel kökenlidir (---) (48). Bu infantlardaki başlıca hemoglobin olan Hb Barts (γ_4), Hb H gibi fizyolojik bir hemoglobin değildir. Delesyondan korunmuş ζ -globin geninin ekspresyonu, fetusu orta gestasyondan geç gestasyona taşıyan yeterli fonksiyonel hemoglobin tetramerlerinin [Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$)] sentezini sağlamaktadır. Doğumda ortalama gestasyonel yaş 32 hafta kadardır. Infantların yaklaşık %50'si ölü doğmakta ve geriye kalanı doğumdan birkaç saat sonra ölmektedir (71). Hb Barts hidrops fetalis sendromu Güneydoğu Asya ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu olup perinatal ölümlerin % 26 sından fazlasının nedeni olabilmektedir. Hb Barts hidrops fetalis sendromlu olguları azaltmak için Güneydoğu Asya ülkelerinde moleküler çalışmalar yapılmakta ve etkin yöntemler geliştirilmektedir (17,60,67,69). Akdeniz ülkelerinde bu sendrom oldukça az görülmektedir (11).

Etkilenen infantlarda yaygın ödem, karında asit, büyük genişlemiş karaciğer, normal ya da hafif büyümüş dalak ve büyük kızarıklık plasenta vardır. Periferik kan incelemesi retikülositoz, target hücreleri, fragmentasyonlu hipokromi ve azalmış ozmotik frajiliteye eşlik eden ciddi bir eritroblastozu ortaya çıkarmaktadır. MCV değeri dolaşan çok sayıdaki çekirdekli eritrositler nedeniyle daima çok yüksektir. Hemoglobin elektroforezi, yüksek düzeyde hemoglobin Barts (γ_4) ile birlikte değişen miktarlardaki (genellikle %10-29) Hb Portlandı ve sınırda Hb H (β_4) düzeyini göstermektedir. Otopsilerinde yaygın ekstramedüller hemopoez ve büyük plasenta görülmektedir (38).

Hidrops fetalisli olguların hemoglobinleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelendiğinde α -talasemi-1'e yol açan delesyonun özelliğine bağlı olarak kan örneklerinde β , G_γ , A_γ ve ζ -zincirleri görülmektedir. ζ -Zincirinin düzeyi β -zinciri ve dolayısıyla fetal yaşla ilişkilidir. ζ -Zincirinin yapımı normal olarak doğumdan birkaç ay

önce durmalıdır. ζ -Zincirinin düşük değerleri ζ -genini içeren bir delesyonun varlığını göstermektedir (65).

4. α -Talaseminin Coğrafik Dağılımı ve Sıklığı

Dünya popülasyonundaki α -talasemi dağılımı falsiparum malaryasının yaygınlığına uymaktadır. Haldane, 1949'da talaseminin tropikal bölgelerde yüksek sıklıkta olduğunu ve heterozigotları malaryaya karşı koruduğunu ileri sürmüştür. Eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, orak hücre trait, β -talasemi trait ve diğer kalıtsal kırmızı hücre anomallikleri gibi α -talasemik kırmızı hücrelerin de malaryal parazit için bir barınak olmadığı görülmekte ve bu durum taşıyıcılara seçici bir avantaj sağlamaktadır (33,110,114).

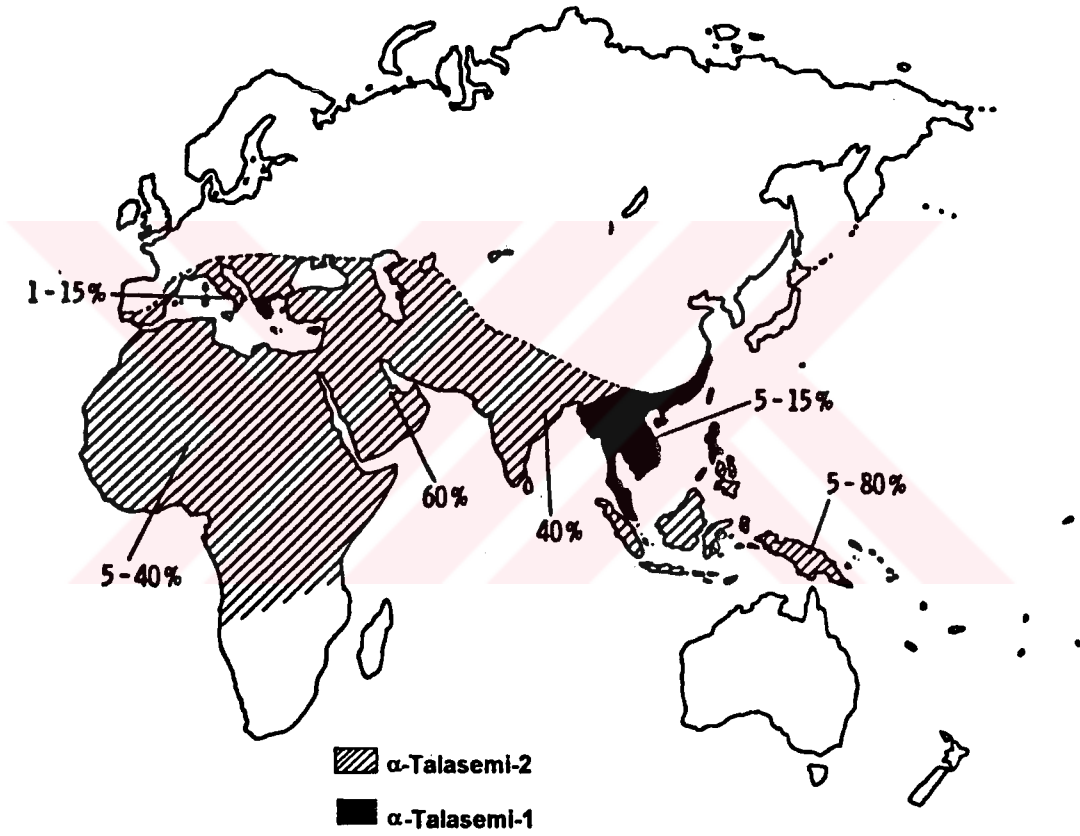
Sıtma karşı doğal elemenin (seleksiyon) hemoglobinoopatileri artırdığına dair kanıtlar vardır. Sıtmanın yaygın olduğu bir bölgede predominant mutasyonun $-\alpha^{3.7}$ III olarak gösterilmesi ve bu mutasyon için tek orijin olması, sıtma ve α -talasemi ilişkisini desteklemektedir (32,33).

4.1. Dünyada α -Talasemi Sıklığı

α -Talasemi, P.falsiparum ile sürekli ya da bir zamanlar etkilenen Güneydoğu Asya, Güney Çin, Okyanus Adaları, Afrika, Akdenizi Çevreleyen Ülkelerde ve Ortadoğuda baskın olarak bulunmaktadır. Diğer ırksal ve etnik gruplarda da zaman zaman bulunmaktadır. Siyah Amerikalılarda da α -talasemi sıklığı çeşitli araştırmalarda yüksek bulunmuştur (Şekil 7) (58,98).

α -Talasemi-1 çok sıklıkla Akdeniz ülkeleri ve Asya popülasyonlarında bulunmakta, Afrika ve Ortadoğuda oldukça nadir görülmektedir. Bununla birlikte α -talasemi-2 delesyon formları büyük sıklıkla Batı Afrika, Akdeniz, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya'da görülmektedir(7,11,31,34,54,58,60,62,69,70,74,83,86,94,98,101,107,112). Papua Yeni Gine'nin bazı bölgelerinde popülasyonun %80'i α -talasemi-2'nin delesyonel formü taşıyıcısıdır. Nondelesyonel α -talasemi-2 formlarının her

populasyonda ne sıklıkta olduğu açık değildir, ancak Akdeniz adaları populasyonunun bazı bölümlerinde, Ortadoğu'nun ve Güneydoğu Asya'nın bazı kısımlarında iyi tanımlanmıştır (7,33-35,43,54,58,69,70,74,86,101,112). Hb Barts hidrops fetalis sendromu ve Hb H hastalığı bir α -talasemi-1 determinant etkisini gerektirdiği için bu bozukluklar Güneydoğu Asyada ve Akdeniz çevresinin bazı bölümlerinde anlamlı sayıda bulunmaktadır (15,54,60-62,67,69,70,94).



Şekil 7. α -Talasemilerin dünyadaki dağılımı.

4..2. Türkiye'de α -Talasemi:

Gen haritalama yöntemi ile 1979 yılında yapılan bir çalışmada, ağır α -talasemili bir olguda Uzakdoğu tipi delesyon, dört olguda ise Akdeniz tipi (ζ - ψ ζ - ψ α ve α_2 -geninin 5' kısmını içeren) delesyon gösterilmiştir (43). Türkiyede Hb SS ve α -talasemi bileşik kalıtımını bildiren yayınlanmış olgular vardır. İki ayrı çalışmada Hb SS+ α -talasemili toplam 12 olgu bildirilmiştir (6). Eti Türklerinde yapılan bir çalışmada orak hücre anemili hastalarda α -talasemi sıklığı %17 olarak bulunmuş, $\alpha^{3.7}$ daha sıklıkla olmak üzere $\alpha^{4.2}$ ile birlikte α -talasemi-2 olguları gösterilmiştir. Aksoy ve arkadaşları Hb H'li olgularda $\alpha^{3.7}$ 'ye bağlı α -talasemi-2 ve 25 kb.lık α -talasemi-1'in birlikteliğini göstermiştir (43).

α -Talasemi-1'e yol açan $-\alpha^{20.5}$ delesyon tipi, Türkiye'de sıklıkla görülmektedir. Bir kromozomdaki iki fonksiyonel α -geni delesyona uğramakta ve homozigot olgular Hb Barts hidrops fetalis sendromuna neden olmaktadır. ζ -globin genleri delesyon dışında kaldığından ζ -globin zincir sentezi sürmekte ve gebelik süresince fetusun etkilenmesi az olmaktadır. Türkiye'de böyle homozigot $-\alpha^{20.5}$ olgularının (-/-) varlığı bildirilmektedir (42).

Ortadoğu ülkelerinde sık görülen α_2 -globin geni poliadenilasyon bölgesindeki AATAAA→AATAAG mutasyonu Türk bireylerde de görülmektedir. Bu mutasyonun homozigotluğu ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$), klinik bulgu ve hematolojik verileri diğerlerinden daha hafif olan Hb H hastalığına neden olmaktadır (30).

Türk popülasyonunda saptanan α -globin varyantları Hb Moabit [$\alpha 86(\text{Leu} \rightarrow \text{Arg})$], Hb Ube-2 [$\alpha 68(\text{Asn} \rightarrow \text{Asp})$], Hb Q-Iran [$\alpha 75(\text{Asp} \rightarrow \text{His})$] ve Hb M Iwata [$\alpha 87(\text{His} \rightarrow \text{Arg})$] dır (6).

4.3. Çukurova Bölgesinde α -Talasemi

Çukurova Bölgesi, Türkiye'nin güneyinde Akdeniz bölgesinde yer alan ve Akdenize kıyısı olan üç ili kapsayan sulu tarımın yaygın şekilde yapıldığı subtropik iklimin egemen olduğu bir bölgedir. Antik dönemden başlayarak yakın dönemlere kadar

ticaret ve/veya kutsal yerleri barındıran merkezlere ulaşma yolları nedeniyle çeşitli uygarlıklara evsahipliği yapmıştır. Göçlerle birlikte heterojen bir nüfus yapısı kazanmıştır. Gerek heterojen nüfus yapısıyla gerekse subtropik iklim kuşağında olması nedeniyle malaryaya karşı korunma amacıyla oluşan doğal seleksiyonun yarattığı mutasyonlar kalıtsal kan hastalıklarının sıklığını ve değişkenliğini artırmıştır. Yer yer kapalı toplum örneği olarak akraba evliliklerinin olması da kalıtsal hemoglobin hastalıklarının günümüze değin gelmesini desteklemiştir. Yapılan çalışmalarda talasemi sıklığı yüksek oranda gözlenmiştir.

Kılınç ve arkadaşları Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile α -talasemi sıklığını araştırmış olup Hb Barts oranlarına bakılarak α -talasemi sıklığını %3.3 olarak bulmuşlardır (59). Yüregir ve arkadaşları, Adana Karataş bölgesinde yaptıkları çalışmada α -talasemi tipi olarak 3.7 kb delesyonu içeren α -talasemi-2 ($\alpha^{3.7}$) ve α -gen triplikasyonlu olguları bulmuşlardır (115,117). Yine Yüregir ve arkadaşları α -talasemi-1 ($\alpha^{\text{MED II}}$) ve yeni bir nondelesyonel α -talasemi-2 birlikteliği ile oluşan Hb H hastalığını tanımlamışlardır. Bu yeni nondelesyonel α -talasemi-2 mutasyonunun, α_2 -globin geni loküsünün poliadenilasyon kuyruğunda (AATAAA→AATGAA) olduğunu göstermişlerdir (116).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Araç ve Gereçler:

1.1. Cihazlar:

1. Coulter Counter	Coulter T-890
2. Microsantrifüj	Fisher 235 B
3. Soğutmalı santrifüj	Sorvall RC-2B
4. Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
5. Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus
6. Minigel elektroforez tankı	Pharmacia GNA-100
7. Güç kaynağı	" EPS
8. Mikrodalga fırın	Vestel Goldstar
9. UV lamba	Cole-Parmer 9814
10. MP4 Kamera	Polaroid MP4 Land Camera
11. Vakum pompası	Savant VP 100
12. Speed Vac konsantratör	Savant SVC 100H
13. Kar makinası	Scotsman AF-10
14. pH metre	Beckman, Century SS 1
15. Su banyosu	
16. Etüv	
17. Otomatik pipet	Gilson 20,100,200 µl

1.2. Kimyasal Maddeler

1. Proteinaz K	Sigma P 6556
2. Agaroz	Bio-RAD 162-0126
3. Etidyum Bromür	Sigma E 8751
4. HbA ₂ Kiti	Isolob QS-7100, QS-7020
5. Taq polimeraz	Perkin Elmer Cetus Amli Taq
6. Mineral oil	Sigma M 5904
7. Deoksi Adenozin trifosfat	Sigma D-4788
8. Deoksi Sitozin trifosfat	Sigma D-4913
9. Deoksi Guanozin trifosfat	Sigma D-5038
10. Deoksi Timidin trifosfat	Sigma T-9656
11. Fenol	Baker 2859-01 500 ml
12. Kloroform	
13. Primerler	
14. GammaDab [¹²⁵ I] Ferritin Radioimmunassay Kit	Nestar Cat. No. CA-1590

1.3. Diğer malzemeler

1. Clear propilene tüp	Coming Tube 25319-15
2. Gene Amp Tüp	Perkin Elmer
3. Ependorff Tüpleri	

2. Örnek Toplama:

Kan örnekleri İçel ili, Mersin merkez, Demirişik köyünden toplandı. EDTA'lı tüplere 38 bireyden 5 ml kan örneği alındı. Toplanan kan örneklerinin Adana'ya taşıma işlemi buz kabında korunarak kara yolu ile yapıldı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına ulaşan örneklerin hematolojik değerleri Coulter Counter

cihazı ile belirlendi. Hemoglobin elektroforezi, Hb A₂ ve Hb F değerlerinin saptanmasından sonra DNA'ları izole edildi.

3. Analiz Yöntemleri:

3.1. Hematolojik İncelemeler:

3.1.1. Coulter Sayımı:

Prensip:

İletken sıvı ortamda iki elektrod ve aralarında daralıp genişleyebilen bir lobül sistem vardır. Tam kandaki şekilli elemanların oluşturduğu parçacıklar ortama süspansiyon halinde verildiğinde büyüklük ve yoğunluklarına göre tübül sistemi daralıp genişlemektedir. Bu sırada sistemin potansiyel enerji farkı değişmekte ve ekranda çırpıntılar (pulse) oluşmaktadır. Çırpıntılarının büyüklüğü ve sayısı, hücre sayısı ve büyüklüğü ile koşuttur. Sisteme giren parçacıklar bu şekilde değerlendirilmektedir (13).

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

3.1.2. Hemoglobin Elektroforezi:

Prensip:

Proteinler taşıdıkları farklı yükler nedeniyle elektriksel bir alanda farklı mesafelere göç ederler. Alkali pH da hemoglobin negatif yüklüdür ve elektriksel bir alanda anoda doğru göç etmektedir. Sellüloz asetat kağıdına uygulanan hemoglobinler elektriksel güç kaynağı ile yaratılan elektriksel alanda yüklerine göre farklı mesafelere göç ederek birbirlerinden ayrılırlar (63).

Ayır lar:

1. Anod Tamponu: 0.26 M Tris Tamponu, pH 9.1

Tris	25.2 gr,
EDTA	2.5 gr,
Borik asit	1.5 gr,

tartılarak 1 litreye distile su ile tamamlanır.

2. Katod amponu: Barbital Tamponu pH, 8.6

Sodyum dietil barbital	5.15 gr,
Dietil barb�tirik asit	0.92 gr,

tartılarak 1 litreye distile su ile tamamlanır.

3. Selüloz asetat elektroforez kağıdı (Sartorius 12200)

4. 500 mg Ponceau-S, 100 ml %5'lik Triklor asetik asitte üzülür.

5. Berraklaştırma ve saflaştırma  zeltisi:

- %5'lik asetik asit,
- %15'lik asetik asit,
- Metanol.

Yöntem:

Elektroforez tankının anoduna ve katoduna uygun tamponlar konulur. Her iki tampondan eşit hacim içeren  zeltide selüloz asetat elektroforez kağıdı en az 10 dakika ıslatılır. Sonra kağıda hemolizattan bir damla uygulanıp elektroforez tankının köprüsüne yerleştirilir. Kağıdın santimetresine 0.2-0.3 mA akım 45 dakika uygulanır. Daha sonra Ponceau-S ile boyanan ve berraklaştırma -şeffaflaştırma  zeltisi ile temizlenen kağıtta hemoglobin tiplendirilmesi yapılır.

3.1.3. Hemogloblin A₂ Ölçümü:

Prensip:

Hemolizat, DE-52 reçinesi ile hazırlanmış kolona uygulanarak Hb A₂, özgün pH ve klorid iyon konsantrasyonu altında diğer hemoglobinlerden ayrıştırılır. Her fraksiyonun absorbens değerleri spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans değerleri daha sonra Hb A₂ yüzdesini hesaplamada kullanılır (QUIK SEP, Hemogloblin A₂ Test System, QS-7100 , QS-7020 . ISOLAB Inc.)

a. Örnek hazırlama:

İki yöntem kullanılabilir.

1. 50 µL tam kan 200 µL distile ya da deiyonize suyla seyreltilir.
2. Yaklaşık 9 gr/dL Hb içeren örnek 0.85% sodyum klorid solüsyonu ile üç kez yıkanır. Bu örneğe eşit hacim su ve 1:5 hacim karbon tetraklorid eklenir, oda ısısında 20 dakika bekletilip hemoliz gerçekleştirilir. Hücre kalıntıları santrifüj işlemi ile uzaklaştırılır. Bu hemolizatın 50 µL'si 200 µL distile suyla seyreltilir.

b. Kolon hazırlama:

1. Kolon dengelendikten sonra 50 µl hemolizat kolona uygulanır ve 200 µl Hb A₂ elüsyonu ile yıkanır.
2. Hemolizat kolona tamamen absorbe edildikten sonra, kolon 4 ml Hb A₂ çözeltisi ile yıkanır.
3. Kolon ikinci çözeltiyle (4 ml) yıkanır. Bu fraksiyon 16 ml suyla seyreltilip 415 nm dalga boyundaki absorbens okunur.
4. Aşağıdaki formül kullanılarak Hb A₂ yüzdesi hesaplanır:

$$\%Hb A_2 = \frac{100A}{A + (5N)}$$

A: Hb A₂ fraksiyonunun absorbanası,

N: Diğer hemoglobinler fraksiyonunun absorbanası

c. Normal değerler:

Sınırları: %1.5-3.0 Hb

Ortalama: %2.4 Hb

3.1.5. HbF Tayini:

Prensip:

Hemoglobinler içerisinde alkaliye karşı en dirençli olanı HbF'dir. Bu özelliğinden faydalanarak HbF miktarı belirlenmektedir. NaOH ile denatürasyondan sonra diğer Hb'ler amonyum sülfat ile çöktürülerek filtre kağıdından süzülür. HbF içeren berrak supernatant solüsyonun absorbanası 540 nm'de okunur. Fetal ve kontrol hemoglobin solüsyonunun optik dansitesi karşılaştırılarak HbF'in yüzdesi saptanır (52).

Ayıraç ve Gereçler:

1. Drabkin solüsyonu:

Na ₂ CO ₃	1g
KCN	0.052g
K ₃ Fe(CN) ₆	0.198g

saf suda çözümlüp hacmi 1L'ye tamamlanır.

2. 1.2 N NaOH

3. Doymuş amonyum sülfat

4. Whatman I kağıdı

5. Test tüpü

6. Pipetler 1, 3 ve 10 ml

7. Spektrofotometre

8. Kronometre

Yöntem:

1. 10 ml Drabkin solüsyonu içerisine 0.4-0.5 ml (6.5 g%) hemolizat konup, iyice karıştırılır.
2. Bu karışımdan her tüpe 3 ml alınır, birisi test diğeri kontrol olarak işaretlenir.
3. Test tüpüne 1,2 N NaOH'ten 0.2 ml konup, çalkalanarak iki dakika beklenip üzerine 2 ml doymuş amonyum sülfat eklenerek reaksiyon durdurulur.
4. Beş dakika sonra Whatman-1 kağıdından filtre edilir.
5. Kontrol tüpüne 0.2 ml H₂O ve 2 ml Amonyum sulfat eklenerek karıştırılır.
6. Kontrolden 1 ml alınarak 4 ml saf su eklenir (1/5 oranında seyrelir).
7. Test tüpü ile kontrol tüpünün absorpsiyonu 540 nm'de okunarak aşağıdaki şekilde HbF değeri hesaplanır.

$$\text{Hesaplama} = \frac{\text{Test tüpünün O.D}}{\text{Kontrol tüpünün O.D.} \times 5} \times 100 = \%F \text{ (AD)}$$

Yorum:

Erişkinlerdeki HbF ortalaması % 1'in altındadır. Anemilerde, lösemilerde ve karsinomalarda yükselmiş HbF seviyesi görülebilir. Orak hücre anemili erişkinlerde HbF seviyesi %15-20'ye kadar ulaşabilir.

3.1.6. Ferritin Düzeyi Ölçümü:**Prensip:**

GammaDab [¹²⁵I] Ferritin Radioimmünassay Kit işlemi, antikor bağlı işaretleyiciyi, bağlı olmayan işaretleyiciden ayırmak için antiserum ayıraç kullanılır. Hasta örneklerinin nonradioaktif ferritini, ferritin standartları ve kontroller, ferritin antikorlarına bağlanma yerleri için ferritin işaretleyicisi ile yarışır. Antikora bağlanacak işaretleyici miktarı, ölçüm tüpünde var olan nonradioaktif ferritin miktarı ile ters orantılıdır.

İmmunopresipitasyonla antikor bağlı işaretleyiciyi, bağlı olmayan işaretleyiciden antikor içeren okturucu antiserum ile ayırırılır. Tupler santrifuj edilerek supernatan atılmakta ve presipitatta bulunan antikor bağlı işaretleyici, gamma sayacında sayılmaktadır. Standart eğri çizilerek hasta omelerinin ferritin konsantrasyonları bu eğriden okunmaktadır (GammaDab [¹²⁵I] Ferritin Radioimmunassay Kit, Nestar Cat. No. CA-1590).

Ayırlar:

1. [¹²⁵I] Ferritin işaretleyici (Cat. No. CA-2671 Kit)

Her şişe 14 ml fosfat tamponu, bovin serum albumini ve koruyucu olarak kırmızı renk için inert olan 0.02 M Sodyum azide ile 4 mCi işaretleyici içerir (2-8°C de saklanır).

2. Tavşan Anti-Ferritin Serumu (Cat. No. CA-2137 Kit)

Her şişe fosfat tamponu, bovin serum albumin ve koruyucu olarak mavi renk için inert olan 0.02 M Sodyum azid ile tavşan anti-ferritin serumu içerir (2-8°C de saklanır).

3. Ferritin okturucu Antiserum Ayıracı, (Cat. No. CA-2713)

Her şişe koruyucu olarak 0.02 M sodyum azid içeren fosfat tamponunda 65 ml keçi veya koyun anti-tavşan serum ve suda ozunebilen polimer içerir. (2-8°C de saklanır).

4. Ferritin Kontrolleri, Duzey I,II; (Cat. No. CA-2417, CA-2418)

Her şişe 2 ml fosfat tamponu, bovin serum albumini ve koruyucu olarak 0.02 M Sodyum azid ile ferritin içerir. Kontroller 10 ve 100 ng/ml'dir (2-8°C de saklanır).

5. Ferritin Koru (Cat. No. CA-2235)

Her şişe 4 ml fosfat tamponu, bovin serum albumini ve koruyucu olarak 0.02 M Sodyum azid içerir (2-8°C de saklanır).

6. Ferritin Standartları (Cat. No. CA-2234, CA-2236, CA-2240)

Her şişe 2 ml fosfat tamponu, bovin serum albumin ve koruyucu olarak 0.02 M Sodyum azid ile ferritin içerir. Standartların konsantrasyonları 2, 5, 20, 50, 200 ve 500 ng/ml'dir (2-8°C de saklanır).

Yöntem:

Yüksek konsantrasyonlardaki ferritin düzeylerinin ölçüm işlemleri:

1. Tüm ayıraçlar çalışma ortamındaki ısıya getirilir ve kullanmadan önce karıştırılır.
2. Aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi polipropilen ya da cam tüpler işaretlenir (Tablo 8).

Tablo 4. Deney şeması.

Tüp No	Tüp İçeriği	
T ₁ , T ₂	Total Sayım (İşaretleyici)	
1, 2	Ferritin Kör, B ₀	0 ng/ml
3, 4	Ferritin Standart	5 ng/ml
5, 6	Ferritin Standart	20 ng/ml
7, 8	Ferritin Standart	50 ng/ml
9, 10	Ferritin Standart	200 ng/ml
11, 12	Ferritin Standart	500 ng/ml
13, 14	Ferritin Kontrol, L II	100 ng/ml
15, 16	Hasta X Ömek	

3. Uygun eşlenmiş tüplere;

- a. 25 µl ferritin körü ve standartları
- b. 25 µl Kontrol, L II
- c. 25 µl Hasta plazma örneği, eklenir.

4. Tüm tüplere 100 µl kırmızı [¹²⁵I] ferritin işaretleyici eklenir.

5. Total sayım (T₁, T₂) tüpleri hariç tüm tüplere 100 µl mavi tavşan anti-ferritin serumu eklenir ve vorteks ile karıştırılır.

6. 37°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilir.

7. Tüm tüplere 500 µl çöktürücü antiserum ayırıcı eklenir. Bir vorteksin düşük hızında hafifçe karıştırılır. Çöktürücü antiserum ayırıcı, magnetik karıştırıcıda devamlı karıştırılır, pipetleme sırasında her 10-15 tüp karıştırıcı barda ya da elle döndürülerek karıştırılır.

8. 37°C de 5 dakika inkübe edilir.
9. Tüm tüpler 1000Xg de 2-12°C'de 15 dakika santrifüj edilir.
10. Total sayımlar hariç her tüp dikkatlice ağzı geniş kırılmaz bir kaba dökülür. Her tüpün ağzı, rezidüel supernatantı uzaklaştırmak için absorban kağıt üzerine bırakılır.
11. Tüm tüpler İodin-125 için uygun ayarlı gamma sayacında 1 dakika süre ile sayılır.
12. Sonuçlar standart eğriden hesaplanır.

Düşük konsantrasyonlardaki ferritin düzeylerinin ölçüm işlemleri:

1. Yüksek sınırlılardaki işlemlerin 2. basamağının ayıraç ve tüpleri 2 ng/ml ferritin standartı ve 10 ng/ml ferritin kontrol L I içerir.
2. Her eşlenmiş tüpe;
 - a. 100 µl ferritin körü ve standartları,
 - b. 100 µl ferritin kontrol, L I ve II,
 - c. 100 µl örnek, eklenir.
3. Tüm tüplere 100 µl kırmızı [¹²⁵I] ferritin işaretleyici konulur.
4. Total sayım tüpü hariç her tüpe 100 µl mavi tavşan antiserumu eklenir. Vorteksle karıştırılır.
5. 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
6. Yüksek konsantrasyonlulardaki işlemlerin 7. basamağı ile devam edilir.

Sonuçlar:

1. Her tüp için dakika sayımı (CPM) kaydedilir.
2. Yarı logaritmik kağıt üzerinde ferritin standardının CPM değerleri vertikal eksene ve ferritin konsantrasyonu horizontal eksene yerleştirilir.
3. Eğri çizilir.
4. Örneklerin ferritin konsantrasyonu yatay eksenden okunarak bulunur. Ferritin düzeyleri tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Ferritin düzeylerinin normal ve demir eksikliği anemisindeki sınırları..

	Erkekler	Kadınlar
18-45 Yaş Normal Sınırlar	36-255 ng/ml	10-64 ng/ml
45-Üzeri Yaş " "	42-262 ng/ml	24-155 ng/ml
Demir eksikliği Anemisi Sınırı	2-8 ng/ml	2-26 ng/ml

4. Moleküler Çalışmalar:

4.1. DNA Elde Edilmesi:

Prensip:

Periferik kandaki kırmızı hücreler hipotonik bir çözelti ile patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositler ayrıştırılmaktadır. Sodyum klorür-tris-EDTA (STE) solüsyonu ile süspansiyon edilerek sodyum dedosil sülfat (SDS) ve Proteinaz K eklenmesiyle proteinler sindirilir. Fenol-kloroform ekstraksiyonu ile DNA purifiye edildikten sonra saf etanolde çöktürülerek genomik DNA elde edilir (88).

Ayırıcılar

1. Retikülosit salin çözeltisi

NaCl	40.90 g
KCl	1.85 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	7.10 g
Distile su ile	1 L'ye tamamlanır

2. Lizis çözeltisi (Taze hazırlanır):

131 mM NH ₄ Cl	7.14 g
0.9 mM NH ₄ HCO ₃	0.07 g
Distile su	1 L'ye tamamlanır

3. STE çözeltisi

0.1 M NaCl	5.84 g
0.05 M Tris	6.05 g
1 mM EDTA	0.37 g
Distile su	1 L'ye tamamlanır

1 L'ye tamamlanmadan önce pH:7.4'e (NaOH-HCl) ayarlanır ve 4°C'de saklanır.

4. Proteinaz K çözeltisi:

25 mg proteinaz K, 2.5 ml 10 mM (pH:7.5) Tris-HCl içerisinde çözülür ve derin dondurucuda (-20°C) saklanır.

5. Fenol:

1000 gr fenol 500 ml saf suda çözülür.Üzerine eşit hacimde 200 mM Tris-HCL pH:8 tamponu ilave edilerek bir kaç kez iyice çalkalanır. Fazlar ayrılıncaya kadar beklenir. Tamponun (üst faz) pH'sı kontrol edilir. pH:8.0 altında ise üst faz atılıp yeni tampon eklenir. Aynı işleme pH:8.0 oluncaya kadar devam edilir. İşlemin sonunda fenol fazının üzerinde bir miktar tampon bırakılıp, fazlası atılır. Konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde hidroksi kinolin eklenir. Bu maddenin çözülmesiyle fenol sarı bir renk alır +4°C'de uzun süre saklanabilir.

6. Fenol/Kloroform/Izoamil alkol: 25/24/1

7. Kloroform/izoamil alkol : 24/1

8. TE solüsyonu, 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH:7.5

Yöntem:

EDTA'lı tüplere alınan 5 ml kan 15 ml'lik ağzı kapaklı plastik santrifüj tüpüne aktarılır. Soğutmalı santrifüjde (+4°C) 10 dakika santrifüj (2500 rpm) edilerek plazması atılır. Çökelen kan hücreleri üzerine 1xRetikülosit solüsyonu konularak karıştırılır. 10 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atılır. Bu işlem üç kez yinelenir. Çökelen hücreler üzerine hemoliz solüsyonu konularak eritrositlerin patlaması için 10 dakika beklenir,

santrifüj edilerek hemolizat ayrılır. Tüpün dibindeki lökositler içinde kırmızı hücreler kalmış ise işlem tekrar edilir. Beyaz hücreler 4 ml STE solüsyonu ile süspanse edilerek 125 µL %20'lik SDS ve 50 µL proteinaz K (10 mg/mL) eklenerek hafifçe karıştırılır. 37°C'de bir gece inkübe edilen bu karışıma 5 ml fenol eklenerek 10 dakika nazikçe karıştırılıp santrifüj edilir. Üst faz alınır, kendi hacmi kadar kloroform-izoamil alkol ile 10 dakika karıştırılır. Santrifüj işleminden sonra üst faz soğuk absolü etanol içine alınır. DNA hava kabarcıkları çıkartarak çökeler. Bir pastör pipeti ile ependorf tüpüne alınan DNA, %70'lik etanol ile yıkanır. Alkol tamamen ayrıldıktan sonra kuru DNA çökeleğinin üzerine (takribi DNA çökeleğinin miktarına göre) 100-200 µL TE tamponu konur. 37°C de bir gece bekletilir. DNA tamamen çözününce 10 µL'si 590 µL saf su ile karıştırılıp 260 nm'deki absorbansı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanır.

$$OD_{260} \times \text{Sulandırma oranı}(60) \times 40 = \mu\text{g/ml}$$

Hazırlanan DNA'nın 280 nm'deki absorbansı da ölçülerek, OD_{260}/OD_{280} oranından verimi kontrol edilir (Bu oran 1.5 ve \uparrow ise kaliteli DNA elde edilmiştir).

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Alfa Gen Amplifikasyonu:

4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Prensibi:

Lökositlerden elde edilen genomik DNA'nın istenilen bölgesinin, in vitro koşullarda öncül (primer) DNA'lar kullanılarak konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkarılmasıdır. Replikasyon ile DNA'nın istenilen bölgesi istenilen miktarda çoğaltılabilmektedir. Tepkimede asıl olay bir replikasyon olup in vivo koşullarla karşılaştırıldığında, öncü DNA görevini primerler ve DNA polimeraz görevini Taq polimeraz enzimi görmektedir (26,54).

Reaksiyonda denatürasyon, yapışma (annealing) ve zincir uzaması (extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur. Denatürasyonda yüksek ısıda genomik DNA'nın çift

sarmalının açılması sağlanmaktadır. Isının primerlerin yapışması için uygun düzeye düşürülmesi ile primer görevi görecek oligonükleotidler, açılmış DNA'nın kendilerine komplementer 3' uçlarına yapışırlar. Uygun yerlere yapışmış oligonükleotidlere, dNTP'lerin Taq polimeraz enziminin yardımıyla eklenmesi için ısının bir miktar yükseltilmesiyle zincir uzaması gerçekleşebilmektedir. Bu döngünün birçok kez tekrarlanması ile özgün hedef parçacığın birikimi yaklaşık 2^n kadar artmaktadır (n ' burada amplifikasyon sürecindeki döngü sayısını göstermektedir) (26,55).

4.2.2. 10XPCR Tamponunun Hazırlanması:

Tris Cl pH 8.8	670 mM
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	40 mM
Amonyum sülfat (NH_4SO_4)	166 mM
β -Merkaptoetanol	100 mM
Bovin Serum Albumin	1 mg/ml
Steril redistile su içinde.	10 ml

4.2.3. Alfa Globin Gen Primerleri:

Tablo 6. Alfa globin gen amplifikasyonunda kullanılan primerlerin baz dizisi (9,11).

Primer	$\psi\alpha_1$ cap site'a göre	Dizi
A	$\alpha_2(5.760-5.782)$	5'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT-3'
B	$\alpha_1(11.344-11.366)$	5'-CCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3'
C	$\alpha_2(7.525-7.548)$	5'-CCATTGTTGGCACATTCCGGGACA-3'
1	5'-(α) ^{20.5}	5'-GCAAGCTGGTGGTGTACACA-3'
2	C1	5'-TGGAGGGTGGAGACGTCCTG-3'
3	3' α_1	5'-CCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3'

4.2.4. Alfa Gen Amplifikasyonu:

İki mikrosantrifüj tüpü alınır, mutant ve normal olarak işaretlenir. Her örnek için 100 µl olmak üzere çalışılacak örnek sayısına göre PCR karışım havuzu hazırlanır (Tablo 6, 7).

Tablo 7. Amplifikasyon koşulları için gerekli PCR karışımının içeriği (9).

İçerik	Konsantrasyon
Tris HCl pH 8.8	67.0 mM
Amonyum sülfat	16.6 mM
β-merkaptoetanol	10.0 mM
MgCl ₂	4.0 mM
Bovin serum albumin	0.1 mg/ml
Dimetilsulfoksit (DMSO)	10.0 %
Deoksi nükleotid trifosfat(dNTP)	200.0 mM
Primer I	25.0 pmol/100 ml
Primer II	25.0 pmol/100 ml
redistile su ile	100.0 µl'ye tamamlanır

Normal ve mutant tüplerin konsantrasyonu tablo 8'de verildiği gibi hazırlanır.

Tablo 8. Amplifikasyon tüplerinin çözelti konsantrasyonu

Mutant		Normal	
10XPCR Tamponu	10.0 µl	10XPCR Tamponu	10.0 µl
DMSO %100	10.0 µl	DMSO %100	10.0 µl
dNTP 6 mM	3.7 µl	dNTP 6 mM	3.7 µl
Primer* 25 pmol/ml	1.0 µl	Primer* 25 pmol/ml	1.0 µl
Primer* 25 pmol/ml	1.0 µl	Primer* 25 pmol/ml	1.0 µl
Redistile su	74.3 µl	Redistile su	74.3 µl
Toplam PCR Karışımı	100.0 µl		100.0 µl

(*) İşaretli primerler $-(\alpha)^{37}$ mutant için A+B ve normal kromozom için A+C'dir, $-(\alpha)^{205}$ mutant için 1+3 ve normal kromozom için 2+3'tür (9,11).

PCR karışımının yarısı amplifikasyon tüplerine alınır ve genomik DNA'dan 1 µg konulur. 6 dakika süre ile 99 °C'de denatüre edilir. Denatürasyon süresinin dolması ile kalan PCR karışımına Taq polimeraz enziminden her örnek için 2.5 Ü konur ve daha sonra denatürasyonu tamamlanmış karışıma 100 µl'yi tamamlayacak şekilde eklenir. Amplifikasyona başlamadan önce tüp içeriğinin buharlaşmasını önlemek amacıyla mineral oil eklenir. Ardından PCR programı uygulanarak amplifikasyon başlatılır.

4.2.5. PCR Programı:

99°C de 6 dakika süreyle ön denatürasyon yapılır. Amplifikasyon programının bir döngüsünde;

94°C de 1 dakika	Denatürasyon,
55°C de 1 dakika	Yapışma (Annealing,)
72°C de 2 dakika	Uzama (Extension),

aşamaları bulunmaktadır. 25 döngü tamamlandıktan sonra amplifikasyon ürününün görüntülenmesi aşamasına geçilir (9).

4.3. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) yöntemiyle β-Globin gen mutasyonlarının inceleme:

Prensip: Lökositlerden elde edilen DNA, β-globin gen mutasyonları için uygun primerler kullanılarak ARMS yöntemiyle çoğaltılır. PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve DNA fragmanının uzunluklarına göre oluşan bantlar görüntülenerek mutasyonlar saptanır (104).

4.3.1. 10xReaksiyon Tamponu

KCl 2M	1250 µl
Tris pH 8.3 1M	500 µl
MgCl ₂ .6H ₂ O 1M	75 µl
Jelatin	5 mg
Steril distile su	3200 µl
Toplam hacim	5025 µl

PCR Karşımı:

10xReaksiyon tamponu	125 µl
dNTP 10 mM	100 µl
Spermidin 1M	1 µl
Steril distile su	774 µl
Toplam hacim	1000 µl

4.3.2. Amplifikasyonda kullanılan primerler:**Tablo 9. ARMS yönteminde kullanılan primerlerin baz dizisi (104).**

Primer adı	Primer dizisi
Kontrol Primer (15)	5'-CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3'
(16)	5'-GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA-3'
Ortak Primer (30)	5'-ACCTCACCCCTGTGGAGCCAC-3'
(31)	5'-CCCCTTCCTATGACATGAACTTAA-3'
IVS I-110 (40) Mutant	5'-ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATAGACT-3'
(41) Normal	5'-ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATAGACC-3'
IVS I-1 (42) Mutant	5'-TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAT-3'
(43) Normal	5'-TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAC-3'
IVS I-6 (46) Mutant	5'-TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG-3'
(59) Normal	5'-TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATA-3'
Kodon 39 (47) Mutant	5'-CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA-3'
(52) Normal	5'-TTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGTCCC-3'
IVS II-1 (49) Mutant	5'-AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTCAA-3'
(58) Normal	5'-AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTCAC-3'
IVS II-745 (50) Mutant	5'-TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGG-3'
(57) Normal	5'-TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGC-3'
Frameshift 8 (54) Mutant	5'-ACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGCAGG-3'
(70) Normal	5'-ACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'

4.3.3. β -Globin gen mutasyonlarının saptanmasında kullanılan amplifikasyon koşulları:

β -Globin gen mutasyonları ARMS yöntemiyle 7 mutasyon için araştırıldı (Tablo 9). Her örnek için iki amplifikasyon tüpü hazırlandı (Tablo 10). Uygun PCR protokolü kullanılarak amplifikasyon başlatıldı.

Tablo 10. Amplifikasyon tüplerinin çözelti konsantrasyonu.

Mutant		Normal	
DNA	0.5 μ g	DNA	0.5 μ g
Kontrol Primer (15)	1.0 μ l (5 pmol)	Kontrol Primer (15)	1.0 μ l (5 pmol)
" " (16)	1.0 μ l (5 pmol)	" " (16)	1.0 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	1.0 μ l (5 pmol)	Normal Primer	1.0 μ l (5 pmol)
" "	1.0 μ l (5 pmol)	" "	1.0 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı	20.0 μ l	PCR Karışımı	20.0 μ l
Taq Polimeraz	0.1 μ l	Taq Polimeraz	0.1 μ l
Toplam hacim	25.0 μ l	Toplam hacim	25.0 μ l

4.3.4. PCR Protokolü:

94°C'de	1 dakika
65°C'de	1 dakika
72°C'de	1.30 dakika
Toplam 25 döngü.	

4.4. Agaroz Jel Elektrofrez:

Prensip:

Elektriksel güç uygulanarak DNA'nın anoda doğru göç etmesi sağlanır. Jel üzerinde bulunan kontrol (marker) DNA yardımı ile moleküler ağırlığı tayin edilir (13).

Ayıracılar:

1. %1.5'lik Agaroz Jel: 1.5 gr agaroz bir miktar 1XTBE tamponunda çözülüp 100 ml'ye aynı tamponla tamamlanır.
2. Etidium Bromür: 5 mg/ml olacak şekilde saf suda hazırlanır.
3. Uygulama (Loading) Tamponu: %0.25 Bromfenol mavisi, %40 sukroz olacak şekilde 1XTBE'de çözülüp pH 7.5'e ayarlanır.
4. 5XTBE Tamponu:

Yöntem:

% 1.5'lik agaroz mikrodalga fırında polimerizasyona uygun hale getirmek için sıvı hale gelinceye kadar ısıtılır. Çalışılan örnek sayısı kadar kuyucuk taşıyan tarak yerleştirilmiş elektroforez kabına agaroz dökülür ve donuncaya kadar beklenir. Polimerize olmuş jel 1XTBE tamponu içeren elektroforez tankına konulur. Bir parça parafilm üzerine her örnek için 0.2 ml uygulama tamponu konulur ve amplifiye olan DNA'ların herbirinden 10 µl alınıp otomatik pipet yardımıyla homojen hale gelinceye dek karıştırılır. Bu karışım agaroz jeldeki uygulama kuyucuklarına uygulanır. Tüm örneklerin uygulanması tamamlandığında elektroforez işlemi başlatılır. Bir saat süre ile 70 V akım verilir. Elektroforez işlemi tamamlandığında jel, etidyum bromür kabına konularak 2-3 dakika boyanır. Ultraviyole lamba ile bantların yürüdüğü mesafeler gözlenir. UV ışık altında kamera ile deney sonucu görüntülenir ve çekilen resimler değerlendirilir.

BULGULAR

Daha önce Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dahiliye Hematoloji bilim dalında Hb H tanısı konulan bir hastanın, Iel ili Mersin merkezine bağlı Demirişik köyünde yaşayan ailesi ile köyde yaşayan diğer fertlerden toplam 38 kan rneėi toplanmıştır.

Örneklerin laboratuvara gelmesinden sonra hematolojik veriler, Coulter Counter otomatik kan sayım cihazıyla incelenmiştir. Örneklerin hemoglobinin elektroforezi, Hb A₂ ve Hb F düzeyleri saptanmış ve talasemili olguları ayırmak için plazma ferritin düzeyi ölçülmüştür. Tüm kan örneklerinin lökosit DNA'sı fenol-kloroform ekstraksiyonu ile ayrıştırıldıktan sonra, ̢-talasemi olasılığı düşünülen örneklerin mutasyonları ARMS tekniği ile, ̑-talasemi düşünülen örneklerin ̑-globin gen delesyonları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile incelenmiştir. Aile içi ve dışı örneklerde bulunan ̑- ve ̢-talasemilerin genotipi sistematik bir çalışma ile gösterilmiştir.

Hematolojik bulgular değerlendirildiğinde, tüm örneklerin hemoglobinin miktarı 6.0-15.5 gr/dl, Hct oranı %21.0-47.2, MCV değerleri 57.6-102.2 fL, MCH miktarı 16.0-32.2 pg ve MCHC oranı %27.8-33.2 arasında bulunmuştur. Hb A₂ ve Hb F miktarları, sırası ile %1.0-6.3 ve %1.5-3.5 olarak bulunmuştur (Tablo 11).

Hematolojik bulguların istatistiksel ortalama değerleri tablo 12'de verilmiş ve tabloda grldğu gibi Hb ortalaması 11.7 gr/dl, Hct %37.7, MCV 79.4 fL, MCH 24.7 pg, MCHC %30.9, Hb A₂ %2.9 ve Hb F %2.2 olarak bulunmuştur.

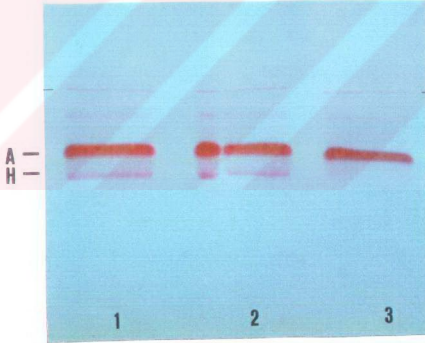
Tablo 11. Örneklerin hematolojik verileri.

Ad-Soyad	C-Y	Hb (gr/dl)	RBC (10 ⁶)	WBC (10 ³)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Hb Ele.	HbA ₂ (%)	Hb F (%)
1.S. K.	E-67	14.6	4.53	11.7	46.3	102.2	32.2	31.6	AA	2.9	3.1
2.B. K.	K-57	11.5	5.69	9.9	39.6	69.5	20.3	29.1	AA	2.1	3.0
3.F. K.	E-30	10.3	5.40	11.3	35.6	65.8	19.1	29.1	AH	1.0	2.1
4.H. K.	K-28	12.4	6.30	12.4	41.4	65.6	19.6	29.9	AA	6.3	3.1
5.S. K.	E-10	11.3	5.69	10.2	37.4	65.7	19.9	30.2	AA	6.2	3.0
26.M. K.	K-38	14.6	5.15	12.2	44.6	86.7	28.3	32.6	AA	2.4	2.0
7.İ. K.	K-34	9.9	5.53	15.4	34.5	62.4	18.0	28.8	AH	1.2	2.1
8.Ö. K.	E-10	12.9	4.72	10.4	40.6	85.8	27.3	31.8	AA	2.6	2.1
9.B. K.	K-8	12.9	5.17	13.5	40.8	79.0	25.0	31.6	AA	2.6	2.0
10.R. K.	E-27	15.5	5.32	11.0	47.2	88.8	29.1	32.8	AA	2.5	3.0
11.R. K.	E-25	9.8	5.33	6.0	35.0	65.6	18.3	28.0	AH	1.2	2.1
12.E. K.	K-20	9.8	4.57	12.6	32.4	70.9	21.4	30.2	AA	1.8	2.8
13.E. A.	E-9	10.5	5.21	12.2	35.5	68.1	20.2	29.7	AA	2.1	2.0
14.E. A.	K-18	11.8	4.79	10.3	38.0	79.2	24.6	31.0	AA	2.4	3.5
15.M. A.	E-55	12.6	4.76	8.2	40.3	84.7	26.5	31.3	AA	2.4	2.5
16.Ş. A.	K-43	7.9	4.35	6.1	27.3	62.7	18.0	28.7	AA	2.2	2.1
17.A. A.	K-51	6.0	3.75	6.9	21.6	57.6	16.0	27.8	AA	1.2	2.5
18.R. A.	E-16	12.1	4.25	10.5	36.7	86.2	28.6	33.2	AA	2.8	2.4
19.A. K.	E-78	13.4	4.32	6.4	41.5	96.0	31.1	32.4	AA	4.3	1.8
20.F. K.	K-67	11.1	4.00	9.0	35.3	88.3	27.9	31.6	AA	2.5	2.4
21.U. K.	K-23	12.4	4.14	10.1	38.0	91.7	30.0	32.7	AA	3.4	2.4
22.Ü. K.	K-21	12.0	4.20	7.8	38.1	90.7	28.7	31.6	AA	3.8	2.0
23.B. K.	K-56	12.1	4.27	7.0	37.7	88.1	28.4	32.2	AA	4.0	1.5
24.N. K.	K-33	13.0	4.79	8.5	41.2	85.9	27.2	31.6	AA	3.7	2.5
25.C. K.	K-16	13.8	4.87	10.1	43.0	88.3	28.3	32.0	AA	2.6	2.6
26.Ö. D.	E-8	11.9	5.35	8.9	38.2	72.9	22.6	31.1	AA	2.6	2.5
27.T. D.	E-71	9.8	4.01	7.3	31.8	79.3	24.4	30.8	AA	2.0	2.5
28.H. D.	K-64	13.2	5.06	10.0	41.5	82.1	26.1	31.8	AA	2.4	1.7
29.G. K.	K-43	11.7	4.08	9.1	36.7	90.0	28.7	31.9	AA	2.3	2.9
30.S. H.	K-31	12.2	4.54	8.0	38.5	84.9	26.9	31.8	AA	2.9	1.6
31.E. H.	K-7	12.3	4.49	13.7	38.8	86.5	27.5	31.7	AA	2.8	1.5
32.H. K.	K-36	11.4	4.48	12.6	36.2	80.8	25.4	31.4	AA	3.3	2.2
33.M. K.	E-67	13.1	4.39	6.9	41.4	94.2	29.8	31.6	AA	2.7	2.4
34.E. T.	K-78	12.4	4.56	8.7	39.0	85.5	27.2	31.8	AA	2.9	1.7
35.S. D.	K-32	10.2	4.89	9.0	34.0	69.6	20.9	30.0	AA	4.9	2.0
36.M. D.	K-8	11.1	5.58	7.8	37.3	66.9	20.0	29.9	AA	4.0	1.8
37.H. D.	E-5	10.0	5.32	7.7	33.7	63.4	18.9	29.8	AA	5.5	1.6
38.S. D.	K-9	12.7	4.53	13.9	39.5	87.2	28.1	32.2	AA	3.4	1.6

Tablo 12. Hematolojik bulguların istatistik verileri.

İstatistik Sonuçları	Hb gr/dl	RBC (10 ⁶)	WBC (10 ³)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	HbA ₂ (%)	Hb F (%)
Ortalama	11.7	4.79	9.8	37.7	79.4	24.7	30.9	2.9	2.2
S.Sapma	1.8	0.57	2.4	4.7	11.3	4.4	1.3	1.2	0.5
S.Hata	0.2	0.09	0.3	0.7	1.8	0.7	0.2	0.2	0.08
Range	9.5	2.55	9.4	25.6	44.6	16.2	5.4	5.3	2.0
En büyük	15.5	6.30	15.4	47.2	102.2	32.2	33.2	6.3	3.5
En küçük	6.0	3.75	6.0	21.0	57.6	16.0	27.8	1.0	1.5
Median	12.0	4.74	9.9	38.0	83.4	26.3	31.6	2.6	2.1

Örnekler hemoglobin elektroforeziyle incelendiğinde, üç olgunun Hb H hastası olduğu gözlenmiştir (Şekil 8). Bu olguların MCV değerleri 62.4, 65.8 ve 65.6 fL olarak bulunmuş ve tüm örneklerin MCV ortalamasından daha düşük düzeylerde oldukları saptanmıştır. Hb H hastalarının Hb, MCH, MCHC, Hb A₂ ve Hb F değerleri tüm örneklerin ortalama düzeyinden düşük iken, eritrosit sayılarının ortalamasının üzerinde olduğu bulunmuştur (Tablo 12,13).



Şekil 8. Hb H hastalarına ait hemoglobin elektroforezi sonucu.

1) İ.K., 2) F.K., 3) R.K.'ya ait elektroforez bulgularını, A harfi Hb A'yı ve H harfi Hb H'yi göstermektedir.

Tablo 13. Alfa talasemili örneklerin hematolojik verileri.

Örnek Adı	Cins Yaş	Hb (gr/dl)	RBC (10 ⁶)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Hb Ele.	HbA ₂ (%)	Hb F (%)	α-Globin Genotipi
S. K.	E-67	14.6	4.53	46.3	102.2	32.2	31.6	AA	2.9	3.1	-α/αα
S. K.	E-10	11.3	5.69	37.4	65.7	19.9	30.2	AA	6.2	3.0	-α/αα
Ö. K.	E-10	12.9	4.72	40.6	85.8	27.3	31.8	AA	2.6	2.1	-α/αα
B. K.	K-8	12.9	5.17	40.8	79.0	25.0	31.6	AA	2.6	2.0	-α/αα
B. K.	K-57	11.5	5.69	39.6	69.5	20.3	29.1	AA	2.1	3.0	---/αα
İ. K.	K-34	9.9	5.53	34.5	62.4	18.0	28.8	AH	1.2	2.1	---/α
F. K.	E-30	10.3	5.40	35.6	65.8	19.1	29.1	AH	1.0	2.1	---/α
R. K.	E-27	9.8	5.33	35.0	65.6	18.3	28.0	AH	1.2	2.1	---/α

α-Globin gen delesyonları PCR yöntemi ile incelendiğinde, 4 olgunun bir α-gen delesyonu, bir olgunun iki α-gen delesyonu ve üç olgunun da 3 α-gen delesyonu içerdiği saptanmıştır. Tek α-globin gen delesyonu içeren iki olgunun (Ö.K.-10 ve B.K.-8) hematolojik verileri normal sınırlar içinde bulunmuş ve bir olguda (S.K.-67) ise MCV düzeyi 102.2 fL olarak bulunmuştur. Hematolojik bulguları ortalama sınırların altında olan S.K. (S.K.-10)'nın MCV düzeyi 65.7 fL ve Hb A₂ düzeyi % 6.2 olarak bulunmuştur (Tablo 13).

İki α-globin gen delesyonuna sahip olgunun (B.K.-57) hematolojik bulgularının normal değerlerin altında olduğu gözlenmiştir. Bu olgunun hematolojik bulgularının tek gen delesyonlu olgularla Hb H hastası olguların bulguları arasında olduğu gözlenmiştir (Tablo 13).

Tablo 11'de gözleendiği gibi 1 ve 19 nolu örneklerin MCV değerleri yüksek bulunmuş ve bu olgularda başka bir hematolojik bozukluk olasılığını araştırmak için vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyleri ölçülmüştür. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında "Solid Phase No Boil Dualcount system for Vitamin B₁₂/Folic Acid" analiz yöntemi ile yapılan incelemede bu olgularda vitamin B₁₂ düzeyi normalden düşük sınırlarda bulunmuştur. Folik asit ise S.K.da düşük ve A.K.da normal sınırlarda bulunmuştur (Tablo 11,14).

Tablo 14. Vitamin B₁₂ ve Folat çalışılan olgulara ait sonuçlar

Örnek Adı	Vit. B ₁₂ (pg/ml)	Folat (ng/ml)	MCV (fL)	Hb A ₂ (%)
1. S.K. (67 Y)	138	1.1	102.2	2.9
2. A.K. (78 Y)	135	4.7	96.0	4.3
Normal değerler	200-950	3.0-17.0		

Bütün örneklerin ferritin düzeyleri incelenmiş, ancak 7 örneğin plazması hemolizli olduğu için çalışma dışı bırakılmıştır. Örneklere ait ferritin değerlerinin ortalaması 59 ng/ml ve standart sapması 60 ng/ml olarak bulunmuş ve sınırların çok geniş olduğu görülmüştür (Tablo 15). 15 örneğin MCV düzeyleri 79 fL'den düşük bulunmuş ve bunların 5'inde Hb A₂ düzeyinin % 3.7'den yüksek olduğu ve ferritin düzeylerinin 17-95 ng/ml arasında olduğu gözlenmiştir. Bu örnekler β-talasemi adayı olarak değerlendirilmiş ve moleküler inceleme için ayrılmıştır (Tablo 16). Hb A₂ düzeyi %3.7'den düşük olan 10 örneğin ferritin düzeyleri 20-263 ng/ml arasında bulunmuştur.

Tablo 15. Demir profili için ferritin düzeyi saptanan olgular

Ad-Soyad	Hb (gr/dl)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ferritin*
1. S. K.	14.6	46.3	102.2	32.2	31.6	68
2. B. K.	11.5	39.6	69.5	20.3	29.1	49
3. F. K.	10.3	35.6	65.8	19.1	29.1	181
4. H. K.	12.4	41.4	65.6	19.6	29.9	95
5. İ. K.	9.9	34.5	62.4	18.0	28.8	263
6. Ö. K.	12.9	40.6	85.8	27.3	31.8	45
7. B. K.	12.9	40.8	79.0	25.0	31.6	36
8. R. K.	15.5	47.2	88.8	29.1	32.8	62
9. R. K.	9.8	35.0	65.6	18.3	28.0	235
10. E. K. (A.)	9.8	32.4	70.9	21.4	30.2	35
11. E. A.	11.8	38.0	79.2	24.6	31.0	33
12. M. A.	12.6	40.3	84.7	26.5	31.3	38
13. Ş. A.	7.9	27.3	62.7	18.0	28.7	25
14. A. A.	6.0	21.6	57.6	16.0	27.8	20
15. R. A.	12.1	36.7	86.2	28.6	33.2	20
16. A. K.	13.4	41.5	96.0	31.1	32.4	27
17. F. K.	11.1	35.3	88.3	27.9	31.6	52
18. U. K.	12.4	38.0	91.7	30.0	32.7	55
19. Ü. K.	12.0	38.1	90.7	28.7	31.6	24
20. B. K.	12.1	37.7	88.1	28.4	32.2	52
21. N. K.	13.0	41.2	85.9	27.2	31.6	58
22. Ö. D.	11.9	38.2	72.9	22.6	31.1	36
23. T. D.	9.8	31.8	79.3	24.4	30.8	24
24. H. D.	13.2	41.5	82.1	26.1	31.8	40
25. G. K.	11.7	36.7	90.0	28.7	31.9	40
26. S. D.	10.2	34.0	69.6	20.9	30.0	17
27. H. D.	10.0	33.7	63.4	18.9	29.8	27
28. S. D.	12.7	39.5	87.2	28.1	32.2	41
29. S. H.	12.2	38.5	84.9	26.9	31.8	36
30. E. H.	12.3	38.8	86.5	27.5	31.7	12
31. M. K.	13.1	41.4	94.2	29.8	31.6	93

* Ferritin düzeyi çalışılmayan örnekler tabloda gösterilmemiştir.

Tablo 16. MCV düzeyi düşük örneklerin bazı hematolojik verileri ve ferritin düzeylerinin sonuçları.

Ad-Soyad	MCV (fL)	Hb A ₂ (%)	Hb Elekt.	Ferritin(ng/ml)*	α -Gen genotipi
1. H.K.	65.6	6.3	AA	95	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
2. S.K.	65.7	6.2	AA	?	$-\alpha/\alpha\alpha$
3. H.D.	63.4	5.5	AA	27	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
4. S.D.	69.6	4.9	AA	17	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
5. M.D.	66.9	4.0	AA	?	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
6. B.K.	79.0	2.6	AA	36	$-\alpha/\alpha\alpha$
7. Ö.D.	72.9	2.6	AA	36	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
8. Ş.A.	62.7	2.2	AA	25	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
9. B.K.	69.5	2.1	AA	49	$-\alpha/\alpha\alpha$
10. E.A.	68.1	2.1	AA	33	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
11. E.K.	70.9	1.8	AA	35	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
12. R.K.	65.6	1.2	AH	235	$-\alpha/\alpha$
13. İ.K.	62.4	1.2	AH	263	$-\alpha/\alpha$
14. A.A.	57.6	1.2	AA	20	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
15. F.K.	65.8	1.0	AH	181	$-\alpha/\alpha$

* (?) işareti olan örnekler plazmaları hemolizli olduğu için ferritin düzeyi ölçülemeyen örnekleri göstermektedir.

Örneklerin DNA'ları lökositlerden izole edilerek DNA derişimleri ölçülmüş ve bulgular tablo 18'de gösterilmiştir. Tablo 17'de görüldüğü gibi 4 örneğin DNA veriminin 1.5'in altında ve diğer örneklerin verimlerinin 1.5'in üzerinde olduğu görülmüştür.

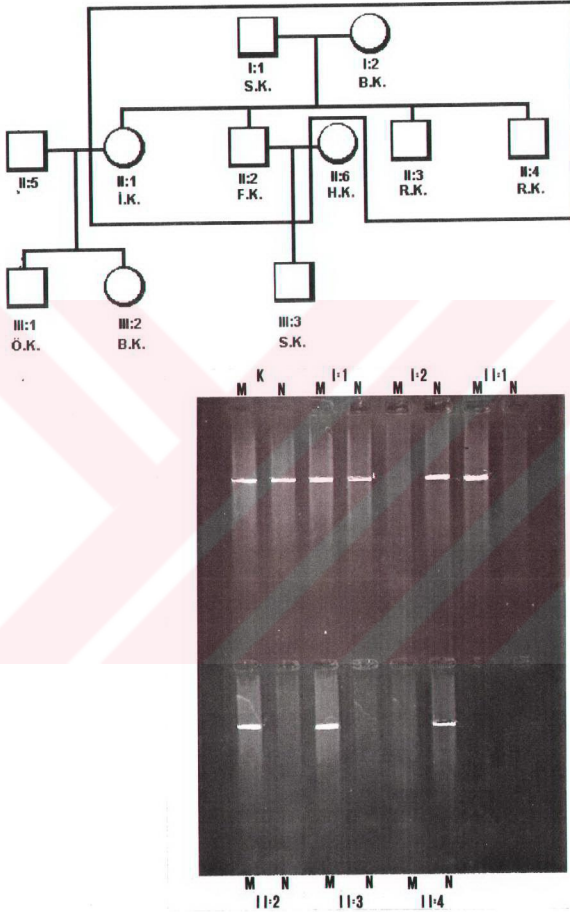
Tablo 17. DNA izolasyonu sonucu saptanan DNA derişimleri.

Ad-Soyad	O.D. ₂₆₀	O.D. ₂₈₀	O.D. ₂₆₀ /O.D. ₂₈₀	Konsantrasyon µg/ml.
1. S. K.	0.140	0.091	1.54	420
2. B. K	0.217	0.131	1.65	651
3. F. K.	0.226	0.142	1.60	678
4. H. K.	0.262	0.182	1.44	786
5. S. K.	0.241	0.161	1.50	723
6. M. K.	0.245	0.166	1.48	735
7. İ. K.	0.360	0.220	1.64	1080
8. Ö. K	0.260	0.183	1.42	780
9. B. K.	0.324	0.210	1.54	972
10. R. K.	0.202	0.126	1.60	606
11. R. K.	0.240	0.150	1.60	720
12. E. K. (A.)	0.320	0.202	1.59	960
13. E. A.	0.105	0.062	1.70	315
14. E. A.	0.155	0.103	1.50	465
15. M. A.	0.128	0.082	1.56	384
16. Ş. A	0.104	0.067	1.55	312
17. A. A.	0.105	0.066	1.59	315
18. R. A.	0.139	0.084	1.65	417
19. A. K.	0.107	0.067	1.59	321
20. F. K.	0.196	0.128	1.53	588
21. U. K.	0.252	0.156	1.61	756
22. Ü. K.	0.267	0.168	1.59	801
23. B. K.	0.299	0.181	1.65	897
24. N. K.	0.168	0.104	1.61	504
25. C. K.	0.308	0.190	1.62	924
26. Ö. D.	0.184	0.108	1.70	552
27. T. D.	0.131	0.083	1.57	393
28. H. D.	0.261	0.150	1.74	783
29. G. K.	0.261	0.171	1.52	783
30. S. D.	0.446	0.273	1.63	1338
31. M. D.	0.074	0.052	1.42	222
32. H. D.	0.112	0.075	1.49	336
33. S. D.	0.147	0.108	1.36	441
34. S. H.	0.228	0.155	1.47	684
35. E. H.	0.178	0.124	1.43	534
36. H. K.	0.162	0.110	1.47	486
37. M. K.	0.155	0.103	1.50	465
38. E. T.	0.250	0.167	1.50	750

* OD₂₆₀ 260 nm.deki absorbanısı, ** OD₂₈₀ 280 nm.deki absorbanısı göstermektedir.

Uygun primerler ve amplifikasyon koşullari kullanılarak bütün örneklerin α -globin genleri $\alpha^{3.7}$ ve $\alpha^{20.5}$ delesyonu açısından incelenmiştir. Toplam 7 örneğin $\alpha^{3.7}$ delesyonu ve 4 örneğin $\alpha^{20.5}$ delesyonu içerdiği saptanmıştır (Tablo 18).

$\alpha^{3.7}$ delesyon tipi araştırılması sonucunda, birinci kuşaktan bir bireyde mutant, ikinci kuşaktan üç bireyde ve üçüncü kuşağın tüm bireylerinde $\alpha^{3.7}$ mutant bantları gözlenmiştir (Şekil 9,10).



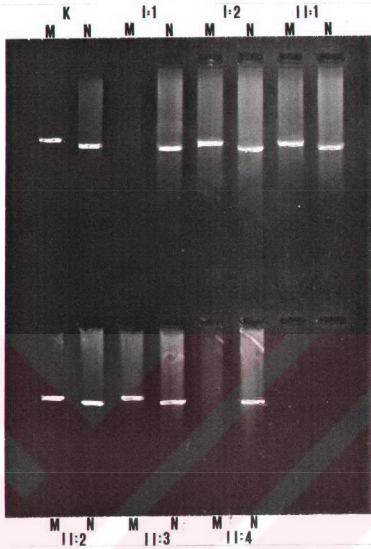
Şekil 9. Birinci ve ikinci kuşağın $\alpha^{3.7}$ delesyonu çalışma sonuçları.

Şekil 9 incelendiğinde, ilk iki bant kontrol örneğine ait olup sırasıyla mutant ve normal kromozomu göstermektedir. Üçüncü ve dördüncü bantlar birinci kuşağın ebeveynlerinden birisine ait olup, bu kişinin bir kromozomunun $\alpha^{3.7}$ delesyonunu içerdiği, diğer kromozomun ise normal olduğu bulunmuştur. Aynı kuşaktan diğer ebeveyne ait olan 5. ve 6. örneklerde normal kromozom bandı gözlenmiştir. 7-8, 9-10 ve 11-12. örnekler ikinci kuşaktan çocuklara ait olup, bu örneklerin $\alpha^{3.7}$ mutant kromozoma sahip oldukları gözlenmiştir. 13. ve 14. örneklerde yalnızca normal kromozom bantı bulunmuş olup bu örnek ailenin 4'üncü çocuğuna aittir. $\alpha^{3.7}$ çalışmasında babanın mutant, annenin normal, üç çocuklarının mutant homozigot görünümü ve bir çocuklarının normal olduğu bulunmuştur.

Hemoglobin elektroforezinde üç örnekte bulunan AH bantları ve hematolojik bulgulardaki düşüklük Hb H hastalığının varlığını göstermektedir. $\alpha^{3.7}$ çalışmasında homozigot görünümü ve normal bantı vermeyen örneklerin, büyük bir delesyon içerdikleri düşünülmüş ve bütün örnekler α -talasemi-1 nedenlerinden olan 20.5 kb delesyon taramasına alınmıştır (Şekil 10, tablo 18).

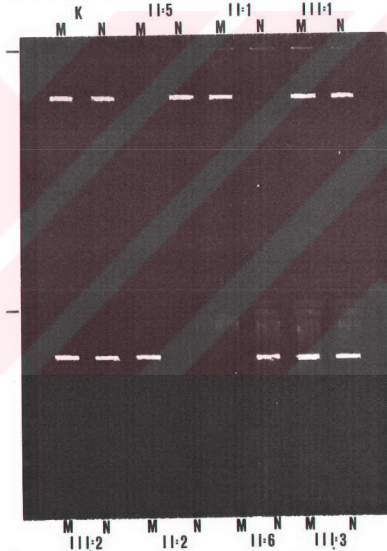
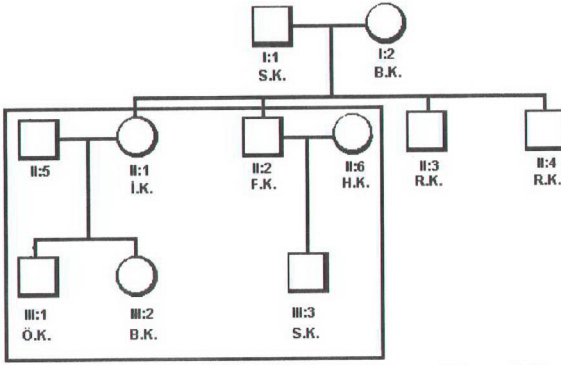
Özgün primerler dışında 20.5 kb delesyonu taraması için de 3.7 kb delesyon koşulları kullanılmıştır. Kontrol örneği olarak daha önce $\alpha^{3.7}$ ve $\alpha^{20.5}$ tanısı konulmuş örnekler kullanılmıştır.

$-\alpha^{20.5}$ delesyon tipi araştırılması sonucunda birinci kuşağın bir üyesinde mutant, ikinci kuşaktan üç bireyde mutant bant gözlenmiştir. Üçüncü kuşağın hiçbirinde mutant bant gözlenmemiştir (Şekil 10, Tablo 18).



Şekil 10. $\alpha^{20.5}$ delesyon tipi araştırılması sonucu.

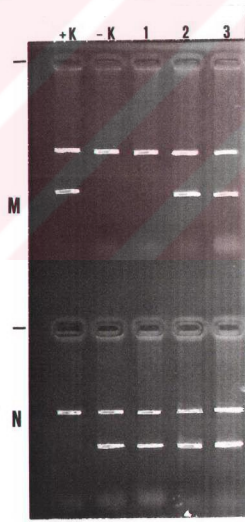
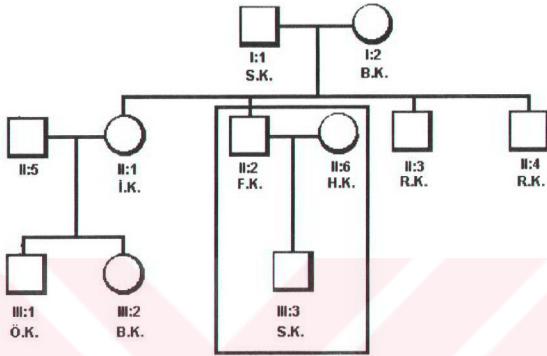
Şekil 10'da ilk iki bant kontrol örneğine ait olup birincisi mutant ve ikincisi normal kromozomu göstermektedir. Üçüncü ve dördüncü amplifikasyon örnekleri daha önce $\alpha^{3.7}$ mutant kromozomu gösteren ebeveyne ait olup 20.5 kb delesyon çalışmasında mutant bant içermediği gözlenmiştir. 5. ve 6. bantlar $\alpha^{3.7}$ delesyonu bulunmayan ebeveyne ait olup 20.5 kb delesyon çalışmasında mutant kromozoma sahip olduğu gözlenmiştir. 7.-8., 9.-10. ve 11.-12. bantlar $\alpha^{3.7}$ mutant bandı bulunan çocuklara ait olup bu örneklerin ayrıca $\alpha^{20.5}$ mutant bandına da sahip oldukları bulunmuştur. $\alpha^{3.7}$ -Mutant bandı olmayan çocukta $\alpha^{20.5}$ mutant bandı da saptanamamıştır (Şekil 10, 13. ve 14. bantlar).



Şekil 11. İkinci ve üçüncü kuşakta $\alpha^{3.7}$ çalışma sonuçları.

İkinci kuşaktan olan ve Hb H hastalığı bulunan üç bireyden ikisinin ailelerinin incelenmesi sonucunda, üçüncü kuşaktaki tüm bireylerde $\alpha^{3.7}$ mutant bantları görülmüştür. İ.K.'nin eşinde yalnızca normal band varken iki çocuğunda mutant bant

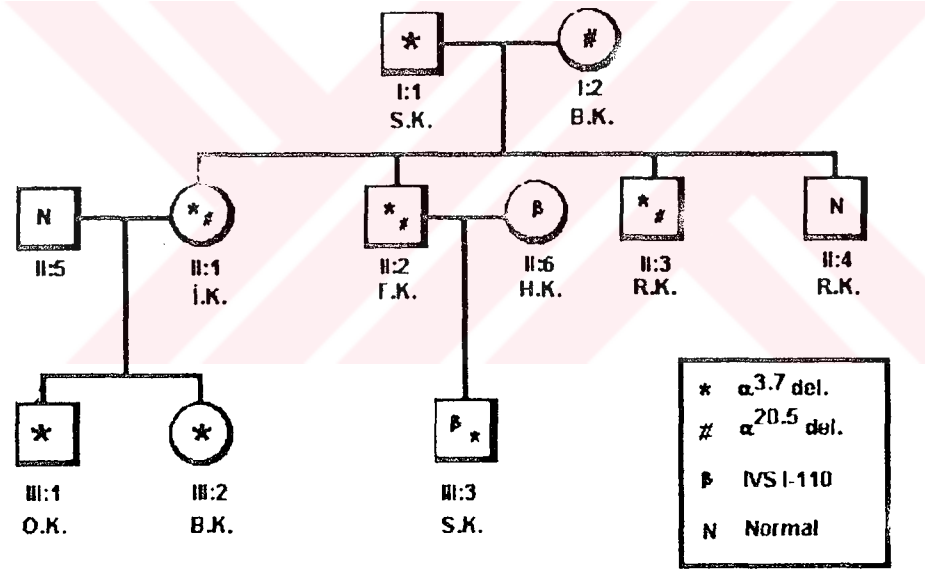
bulunmuştur. F.K.'nın eşi α -geni için normal banda sahip olup çocuğunda $\alpha^{3.7}$ mutant band bulunmuştur (Şekil 11). Bu eş β IVS I-110 mutasyonuna sahip olup 10 yaşındaki çocuğunda $\alpha^{3.7}$ ile birlikte β IVS I-110 mutasyonuna ait mutant kromozom bandı da bulunmuştur(Şekil 12).



Şekil 12. β IVS I-110 mutasyonu çalışma sonuçları.

Şekil 12'de üst sırada mutant kromozoma ait bantlar ve alt sırada normal kromozoma ait bantlar gözlenmektedir. Üst sıra incelendiğinde, üçüncü band F.K.'ya ait olup bu olguda β IVS I-110 mutasyonu olmadığı, 4. ve 5. bantların anne ve çocuğa ait olup β IVS I-110 mutasyonuna sahip olduğu görülmüştür. Alt sıra incelendiğinde, bu iki olguda normal kromozomların da bulunması heterozigotluğun söz konusu olduğunu göstermiştir. S.K.'nın bileşik heterozigotluğa sahip bir kalıtım gösterdiği bulunmuştur.

Moleküler düzeydeki incelemeler sonucunda, örneklerin üçünde $\alpha^{3.7}$ ve $\alpha^{20.5}$ delesyonlarının birlikte bulunduğu, dördünde yalnızca $\alpha^{3.7}$ delesyonunun bulunduğu, birinde $\alpha^{20.5}$ delesyonunun tek başına bulunduğu görülmüştür. Yine moleküler düzeydeki incelemeler $\alpha^{3.7}$ taşıyıcısı bir bireyde β IVS I-110 mutasyonunun varlığını ve annesinin de aynı mutasyonu taşıdığını göstermiştir (Şekil 13, Tablo 18).



Şekil 13. Moleküler düzeyde incelemenin aile ağacında gösterimi.

Tablo 18. Moleküler düzeyde inceleme sonuçları.

Örnek Adı	Cins-Yaş	$\alpha^{3.7}$ Del.	$\alpha^{20.6}$ Del.	β IVS I-110	α -Globin Genotipi
1. S. K.	E-67	+	-	-	$-\alpha/\alpha\alpha$
2. S. K.	E-10	+	-	+	$-\alpha/\alpha\alpha$
3. Ö. K.	E-10	+	-	-	$-\alpha/\alpha\alpha$
4. B. K.	K-8	+	-	-	$-\alpha/\alpha\alpha$
5. B. K.	K-57	-	+	-	$--/\alpha\alpha$
6. İ. K.	K-34	+	+	-	$--/-\alpha$
7. F. K.	E-30	+	+	-	$--/-\alpha$
8. R.K.	E-27	+	+	-	$--/-\alpha$

Hb A₂ düzeyi % 3.7 üzerinde olan 6 örneğin (K. ailesinden) ve hedef aile ile akrabalığı olmayan 4 kişilik bir ailenin (D. ailesi) β -geni ARMS yöntemiyle 7 mutasyon için taranmıştır. Tabloda görüldüğü gibi K. ailesinden 2 kişide ve D. ailesinden 3 kişide IVS I-110 mutasyonu bulunmuştur (Tablo 19).

Tablo 19. Hb A₂ düzeyi yüksek örneklerin hematolojik ve moleküler inceleme sonuçları.

Ad-Soyad	MCV (fL)	Hb A ₂ (%)	β-Gen mutasyonu	α-Gen delesyonu
1. H.K.*	65.6	6.3	IVS I-110	-
2. S.K.	65.7	6.2	IVS I-110	-α ^{3.7} /αα
3. A.K.	96.0	4.3	?	-
4. B.K.	88.1	4.0	?	-
5. Ü.K.	90.7	3.8	?	-
6. N.K.	85.9	3.7	?	-
7. H.D.	63.4	5.5	IVS I-110	-
8. S.D.**-32	69.6	4.9	IVS I-110	-
9. M.D.	66.9	4.0	IVS I-110	-
10. S.D.-9	87.2	3.4	Normal	-

Tablo 19'da (?) işaretli örneklerin β-globin geni ARMS yöntemiyle 7 mutasyon için araştırıldığında herhangi bir mutasyonun bulunamamıştır. K. ailesinde H.K.* anneyi ve S.K. onun çocuğunu, D ailesinde ise, S.D.**-32 anneyi ve H.D., M.D. ile S.D.-9 onun çocuklarını göstermektedir. D ailesinde babadan örnek alınamamıştır.

TARTIŞMA

İnsan genetiği, bireylerin değişkenliklerinin bilimsel çalışması olup, medikal genetik bu ilkelerin tıptaki çalışmalara uygulanmasıdır. Moleküler genetik tekniklerinin kullanımı, genetik hastalıkların neden bir populyasyonda ortaya çıktığı sorusuna yeni yaklaşımları olanaklı kılarken moleküler tekniklerin başarısı da genotip ve haplotip analizlerine bu yöntemlerin uygulanabilmesini sağlamaktadır (21,32).

Hemoglobinopatiler moleküler düzeyde incelenmiş ilk genetik hastalıklardır. Bunlar sık rastlanan genetik bozukluklardır ve gen sıklıkları populyasyonlarda farklı olarak ortaya çıkmaktadır. Bir genetik varyant, enfeksiyon hastalıklarına karşı koruma sağlıyorsa gen sıklığındaki azalma enfeksiyon hızını bozacak ve epidemiyi kıracaktır. Globin gen çalışmalarının epidemiyolojik ve moleküler verilerinin birleştirilmesi, insan populyasyonlarındaki genetik varyantların araştırılması için uygun olacaktır. Klasik bir örnek olarak, orak hücre anemisi taşıyıcılarının sıtmaya karşı dirence sahip olmaları gösterilebilir. Sıtmaya karşı doğal elemanın (seleksiyon) hemoglobinopatileri artırdığına dair kanıtlar vardır (32).

Sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde α -talasemi sıklığı da artmaktadır. Sıtma ve α -talasemi ilişkisi ilk olarak Malezya'da bildirilmiştir. Kromozomların haplotip analizi bu bölgede predominant mutasyonun ($\alpha^{3.7}III$) tek orijini olduğunu güçlü olarak desteklemektedir (32,33,48). Subtropik iklim kuşağında bulunan ülkemizde ve özellikle bölgemizde diğer hemoglobinopatilerle birlikte α -talasemi delesyon ve mutasyonlarının sıklığının yüksek olduğunu düşündürmektedir.

ukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından çeşitli projelerin desteğiyle başlatılan ve yürütülen tarama çalışmalarından önemli sonuçlar sağlanmıştır. Kalıtsal kan hastalıklarının bölgedeki sıklıkları saptanmış ve moleküler düzeyde araştırmaya yönelik bir 'genetik laboratuvarı' kurulmuştur. Böylece α -talasemi

delesyon tiplerinin araştırılması amacıyla bu laboratuvarında gerekli yöntemler kurularak moleküler düzeyde çalışmaya başlanmıştır.

α -Talasemiler, α -globin gen sentezinde bir azalmayla karakterize olan heterojen kalıtsal anemi grubudur. α -Talasemi tanısı koymak zordur, çünkü hematolojik ve biyokimyasal ölçütler normal bireylerden her zaman için farklı olmamaktadır. Tek α -globin gen delesyonu genellikle hematolojik olarak belirgin değildir. α -Talasemi taşıyıcısı fenotipli bireyler mikrositoz, düşük MCV, MCH, normal Hb A₂ ve Hb F değerlerini göstermektedir.

α -Talasemi çalışmalarında örnek seçimi, laboratuvar bulgularının normal sınırlarını da içerecek şekilde büyük bir değişkenlik göstermesi nedeniyle iyi bir planlamayı gerektirmektedir. Örneklerin tam kan sayımının ardından MCV değerleri göz önüne alındığında 79 fL'den daha düşük olan olguları, β -talasemiden ayırmak için Hb A₂ düzeyinin saptanması gerekmektedir. Hb A₂ düzeyi > 3.7% olanlar β -talasemiyi düşündürürken Hb A₂ düzeyi < 3.7% olan olgularda α -talasemiyi düşündürmektedir. Burada karşımıza aynı verilere sahip demir eksikliği anemisi de çıkmaktadır. Bu olguların demir düzeylerinin normal sınırlarda ya da yüksek değerlere sahip olması α -talasemi olasılığını büyük ölçüde artırmaktadır. Bütün bunların yanı sıra MCV değeri > 79 fL olan olgular ile MCV değeri < 79 fL ve Hb A₂ düzeyi < 3.7 % olan olgular da α -talasemi taşıyıcısı olabilmektedir. α -Talasemilerin tam tanısı için DNA temelindeki yöntemler kullanılarak moleküler düzeyde çalışma yapılmalıdır (13,81,97).

Bu çalışmadaki örneklerin hematolojik bulguları incelendiğinde; hemoglobin ortalaması 11.7 gr/dl, Hct 37.7 %, MCV 79.4 fL, MCH 24.7 gr/dl, MCHC 30.9 %, Hb A₂ 2.9 % ve Hb F 2.2 % olarak bulunmuştur. Hematolojik bulguların her birinin sınırları oldukça geniş olup; hemoglobin 6.0-15.5 g/dl, Hct %21.0-47.2, MCV 57.6-102.2 fL, MCH 16.0-32.2 g/dl, MCHC %27.8-33.2, Hb A₂ %1.0-6.3 ve Hb F %1.5-3.5 arasında bulunmuştur (Tablo 12). Anomal hematolojik bulguların görülmesi örnekler arasında hemoglobinopati bulunma olasılığını desteklemektedir. Örneklerin her birinin hematolojik bulgularının ayrıntılı incelenmesi ve üst düzeyde yöntemlerle desteklenmesi gereğini ortaya çıkarmaktadır (Tablo 11).

Hemoglobin elektroforezi incelemesi sonucu 3 ömekte Hb H'ı gösteren AH bantları ve geriye kalan 35 ömekte Hb A'yı gösteren AA bandı gözlenmiştir (Tablo 11). AH bantlarının gözlenmesi α -talasemili olguların varlığının ilk işareti olarak değerlendirilmiştir. MCV değerleri düşük olan ve Hb A₂ değerleri de normal ya da düşük olan olgularda demir eksikliğinin gözardı edilmesiyle α -talasemi olabilecek örneklerin de ayrılmasını sağlamıştır (Tablo 15). Alfa talasemili örneklerin incelemesinde hemoglobin elektroforezlerinde AH bandı bulunan F.K., İ.K., ve R.K. adlı Hb H hastalarına ait MCV değerleri 66 fL'den düşük olarak bulunmuştur. Bu değerler tüm örneklerin ortalamasından daha düşük düzeyleri göstermektedir. Hb H hastalarının Hb, MCH, MCHC, Hb A₂ ve Hb F değerleri de tüm örneklerin ortalama düzeyinden düşük, eritrosit sayısı ise ortalamanın üzerinde bulunmuştur (Tablo 11,13).

Çalışmamızda demir düzeyi için depo demiri olan plazma ferritini incelenmiştir. Tüm ömeklere ait ferritin değerlerinin ortalaması 59 ng/ml ve standart sapması 60 olarak bulunmuştur. Burada çok geniş sınırlar söz konusudur (Tablo 15). Ferritin düzeyi üç alfa geni eksik olan olgularda 181, 235 ve 263 ng/ml gibi yüksek değerlerde bulunmuştur (Tablo 16). Skogerboe ve arkadaşları Hb H hastalarının ferritin değerlerini 160 ng/ml.den yüksek bulmuşlardır. Delesyona uğrayan α -globin gen sayısının artışı ile birlikte ferritin düzeyindeki artış arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir (97). Bu çalışmada α -gen delesyonuna sahip olgularda ferritin düzeyi 36 ng/ml üzerinde saptanmıştır. Tek bir gen eksikliği ve bir kromozomunda her iki α -geni delesyona uğramış olgularda ferritin düzeyi normal sınırları göstermektedir. Çalışmada yer alan ve α -talasemi taşıyıcısı ya da hastası olmayan olgularda düşük hematolojik verilerle birlikte düşük ferritin değerleri bulunmuştur Hb H hastalarındaki ferritin değerlerinin yüksekliği kronik hemolitik olayın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda kullanılan örneklerde delesyona uğrayan α -genlerinin sayısındaki artış ferritin düzeyindeki artışla paralellik göstermektedir (Tablo 16).

Ömeklerin 15'inde MCV düzeyleri 79 fL altında bulunmuştur. Bunlardan 5'inde Hb A₂ düzeyi % 3.7'den yüksek düzeylerde ölçülmüştür. MCV değerleri düşük ve Hb A₂ düzeyleri normal olan örneklerden 3'ünde hemoglobin elektroforez bulgusu olarak AH bandı gözlenmiştir. Örneklerin ferritin düzeyleri incelendiğinde 6 ömeğin ferritin düzeyi 36 ng/ml 'den düşük ve birinde ise 49 ng/ml olduğu ve bu olgunun iki α -globin gen

delesyonu içerdiği gözlenmiştir (Tablo 16). MCV düzeyi düşük ve Hb A₂ düzeyi normal olan olgularda depo demiri miktarı dikkat çekicidir. Çalışılan ferritin yönteminin belirtmiş olduğu normal sınırlar içinde kalınmasına karşın alt sınırlar söz konusudur (Tablo 9). MCV düzeyi düşük olan olguların Hb A₂ düzeyi yüksek olan 5 bireyinin tamamı β -talasemi mutasyonunu taşımaktadır. Düşük MCV ve normal Hb A₂ düzeylerine sahip olgularda alfa talasemi varlığı söz konusu olduğunda ferritin düzeyleri yüksek bulunmuştur. İşte düşük MCV ve normal Hb A₂ düzeylerine sahip olan bu geriye kalan olgularda ferritin düzeyi, diğerlerine göre daha düşük değerleri göstermektedir. Önerilen anemi sınırlarının biraz üstünde olmasına karşın bu olguların demir eksikliği anemisi olarak değerlendirilmesini hematolojik ve moleküler inceleme bulguları da desteklemektedir.

Hb A₂ düzeyi %3.7'den yüksek bulunmuş olan K. ailesinden beş kişide ve dört kişilik D. ailesinde β -globin geni mutasyonlar açısından incelenmiştir. K. ailesinden iki ve D. ailesinden üç bireyde β IVS I-110 mutasyonu bulunmuş ve bir bireyin normal olduğu bulunmuştur. K ailesinden geriye kalan 3 bireyde Hb A₂ yüksek, fakat MCV değeri normal düzeydedir. Bu 3 olgu ARMS yöntemi ile β -talasemi yönünden 7 mutasyon için incelendiğinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır (Tablo 19).

Tek α -globin gen delesyonuna sahip α -talasemili olguların ikisinde (Ö.K. ve B.K.) hematolojik veriler normal sınırlar içinde bulunmuştur. Olguların birinde (S.K.-67) ise MCV düzeyi yüksek (MCV 102.2 fL) bulunmuştur. Bu olguda vitamin B₁₂ ve folat düzeyi çalışılmış ve düşük bulunmuştur. MCV düzeyindeki bu yükseklik vitamin B₁₂ ve folat değerlerindeki düşüklüğe bağlı oluşan megaloblastik anemiye bağlıdır (Tablo 14). Hematolojik bulguları ortalama sınırların altında olan olguda (S.K.-10) Hb A₂ düzeyinin % 6.2 gibi yüksek bir düzeyi göstermesi dikkat çekici bulunmuştur. Bu olgunun MCV değeri de beklendiği gibi düşük düzeyde ölçülmüştür. Bu olgunun β -talasemi mutasyonu taşıdığı düşünülmüş ve yapılan moleküler incelemeler bu öngörüü desteklemiştir (Tablo 19).

İki α -globin gen delesyonuna sahip α -talasemili bir olgudaki (B.K.) hematolojik bulgular ortalama değerlerin altında gözlenmiştir. Hematolojik bulgular tek gen delesyonlu olgularla Hb H hastası olguların verileri arasında değerleri göstermektedir (Tablo 13).

İki örneğe ait (S.K.-67 Y ve A.K.) MCV değerleri yüksek bulunduğundan bu olgularda başka bir hematolojik bozukluk olasılığını araştırmak için vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyleri ölçülmüştür. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılan inceleme sonucunda iki olgunun vitamin B₁₂ düzeyi düşük sınırlarda saptanmış olup bir olguda folik asit düzeyindeki düşüklük te birlikte bulunmuştur. (Tablo 14).

α -Talasemi-2, bir kromozomdaki iki α -globin geninden birinin delesyonu ya da nondelesyonel mutasyon sonucunda oluşmaktadır. Şu ana kadar yedi tip α -talasemi-2 determinantı tanımlanmıştır (9). Delesyonel α -talasemi-2'lerden 3.7 kb delesyonla oluşan $-\alpha^{3.7}$ delesyon tipi, zencilerde (%30), Asyalılarda (%1-98), Pasifik adalarında (%30-90) ve Akdenizlilerde (%4-18) sık görülmektedir (33). Heterozigotlardaki fenotip hastalık belirtisi göstermemekte ve hematolojik olarak belirgin bulgu vermemektedir.

PCR analizi genetik hastalıkların tanısında özellikle kullanışlı bir yöntemdir. Bowden ve arkadaşlarının geliştirdikleri PCR ile α -talasemi-1 delesyonlarını tanımlama tekniği, moleküler düzeydeki incelemeleri kolaylaştırmıştır (11). Dode ve arkadaşları bu yöntemi α -talasemi-2 tiplerinin tanımlanmasında da kullanmışlardır. $-\alpha^{3.7}$ tanısı için restriksiyon haritalamayı gerçekleştirmişler ve $-\alpha^{3.7}$ I, $-\alpha^{3.7}$ II ve $-\alpha^{3.7}$ III tiplerini ayırtedebilme olanağını yaratmışlardır (24,25). Baysal ve arkadaşları 1994 yılında kolay ve ancak birkaç saati alan daha kısa süreli bir tekniği geliştirmişlerdir (9,10).

Çalışmamızda uygun primerler kullanılarak Baysal ve arkadaşlarının $-\alpha^{3.7}$ delesyonunun PCR ile moleküler düzeyde tanımlanması tekniği kullanılmıştır. Dört olguda yalnızca heterozigot $-\alpha^{3.7}$ delesyonu ve üç olguda hemoglobin elektroforezindeki Hb AH varlığının da desteklediği gibi α -talasemi-1 ile $-\alpha^{3.7}$ delesyonu bileşik heterozigotluğu saptanmıştır. Yalnız $-\alpha^{3.7}$ delesyonu için heterozigot olan olgularda normal MCV, MCH, MCHC, Hb A₂ ve ferritin değerleri bulunmuştur (Tablo 13, tablo 15). α -Talasemi-1 ile bileşik heterozigotluğu olan olgularda ise, düşük MCV, MCH, MCHC ve normal Hb A₂ değerleri gözlenmiştir (Tablo 13). $-\alpha^{3.7}$ delesyonlu bir olguda düşük MCV değeri ve yüksek Hb A₂ düzeyi β -genindeki bir mutasyonun da varlığını göstermiştir. Ailenin ebeveynlerinden biri $-\alpha^{3.7}$ delesyonu ile oluşan α -talasemi-2 taşıyıcısı olarak

saptanmıştır. Dört çocuğundan üçüne bu delesyonun kalıtımının olduğu gösterilmiştir. Üçüncü kuşağın tamamına bu delesyonun kalıtımının varlığı da gösterilmiştir (Şekil 11).

α -Talasemi-1, bir kromozomdaki iki fonksiyonel α -globin geninin her ikisinin delesyonu sonucunda oluşmaktadır. α -Talasemi-1'e neden olan $-\alpha^{\text{MED I}}$, $-\alpha^{\text{MED II}}$ ve $-\alpha^{20.5}$ delesyon tipleri Akdenizli populasyonda sık görülmektedir (48). Önceleri α -talasemi-1 taşıyıcılarını saptama stratejisi, restriksiyon haritalama yöntemini temel almakta ve anormal fragmanlara özgü radyoaktif işaretli problemleri kullanılarak yapılmaktaydı. Daha az özgün ve daha az duyarlı olan öteki araştırma yöntemleri ise, hematolojik verilerin değerlendirilmesi, immunolojik olarak Hb Barts miktarının saptanması ve ζ -globinin baskın ekspresyonunu ölçen radyoimmünassey yöntemlerden oluşmaktadır. Bowden ve arkadaşları kısa süreli ve özgün α -talasemi taşıyıcılarını saptayıcı PCR protokolünü tanımlamıştır (11). Çalışmamızda bir kromozomunda iki α -genini kapsayan 20.5 kb.lık bir delesyon içeren heterozigot bir olgu ve bu delesyonun $-\alpha^{3.7}$ delesyon tipi ile bileşik heterozigot olduğu üç olgu saptanmıştır. Bu da, karşılaştığımız α -talasemi-1 tipinin $-\alpha^{20.5}$ delesyon tipi olduğunu göstermiştir. Şekil 10'da görüldüğü gibi ailenin ebeveynlerinden biri $-\alpha^{20.5}$ delesyonu ile oluşan α -talasemi-1 taşıyıcısı olarak saptanmıştır. Bu delesyonun çocuklarından 3'üne kalıtıldığı ve diğer ebeveyninden kalıtılan α -talasemi-2 ile Hb H hastalığına yol açtığı gösterilmiştir. $-\alpha^{20.5}$ Delesyonuyla oluşan α -talasemi-1'in ailenin ikinci kuşağında tek başına kalıtımı gözlenmemiştir (Tablo 18 ,Şekil 10).

Hb H hastalığı, yaşamla bağdaşabilen en ciddi α -talasemi sendromudur. Hipokromi ve mikrositoz ile karakterize bir kronik hemolitik anemidir. Normal insanlarda bulunan dört α -globin geninin üçünün delesyon ya da inaktivasyonu ile oluşmaktadır. α -Talasemi-1 ve α -talasemi-2 genlerinin birarada oluşu Hb H hastalığının genotiplerinden biridir. Hb H hastalığına neden olan α -talasemi-1 ve α -talasemi-2 tipleri populasyonlar arasında farklılık göstermektedir (48). Hb H hastalığı yaygın olan Güneydoğu Asya Ülkelerinde α -talasemi-1 nedeni en sık $-\alpha^{\text{SEA}}$ iken, α -talasemi-2 nedeni $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ delesyonu veya α^{CS} nondelesyonel biçimleri olarak gözlenmektedir (16,18). Akdeniz ülkelerindeki Hb H hastalığına yol açan en sık α -talasemi-1 tipleri $-\alpha^{\text{MED I}}$, $-\alpha^{\text{MED II}}$, $-\alpha^{20.5}$ ve α -talasemi-2 tipinin $-\alpha^{3.7}$ mutasyonu olduğu bildirilmektedir (34,43). Çalışmamızın amacı Çukurova bölgesindeki α -talasemi olgularını moleküler düzeyde incelemek olduğu için.

α -Talasemi-1 ve α -talasemi-2'nin nedeni olan delesyonların her biri için uygun primer kullanımıyla yapılan moleküler inceleme ve Hb H hastalığı bulunan bir ailedeki α -talasemi taşıyıcı ve hastalarının saptanmasını sağlamıştır. Hb H hastalığına yol açan α -talasemi-1'in nedeni $-\alpha^{20.5}$ delesyonu ve α -talasemi-2 nedeni de $-\alpha^{3.7}$ delesyonudur (Şekil 13,Tablo 18).

α -Talasemilerle hemoglobinopatiler arasında bir etkileşim bulunmaktadır. α -Globin varyantları ile α -talasemi-1 ya da α -talasemi-2 birarada bulunabilmektedir. Bir α -globin mutanti ile α -talasemi etkileşiminin en iyi örneği, HbG Philadelphiadır. genellikle bir $-\alpha^{3.7}$ kromozomda kodlanmaktadır. Sık olmayarak α -talasemi ile ilişkili yüksek ya da düşük yüzdeli α -globin varyantları da oluşabilmektedir. Çeşitli α -globin varyantlarına eşlik eden α -talasemi-1'li olgulara ait hematolojik ölçütlerde önemli derecede bir düşüklük gözlenmektedir (1,8,12,20,23,39,48,51,53,80,99,100,111,112). α -Talasemi ile β -talasemi birarada bulunabilmektedir. Globin alt birimlerinin $\alpha\beta$ dimerlerine kendiliğinden ve hızlı kombinasyonu, bir hemoglobin tetramerinin biçimlenmesinde en önemli sonucu oluşturmaktadır. α ve β - zincirlerinin birleşmesi, her alt birimin taşıdığı yüke bağlıdır. Normal α ve β -monomerler, sırasıyla yaklaşık eşdeğer oranda pozitif ve negatif yüklere sahiptir ve bu karşıt kutupların elektrostatik çekimiyle birleşmektedirler. Normalden çok ya da az negatif yüke sahip durağan varyant β -zincir varlığında bu varyant eşit miktarda β^A -zinciri ve farklı konsantrasyonlarda normal α -zinciri ile birleşmektedir. Hb A ve varyant tetramer bileşimi, β alt birimlerinin yüküne ve α zincirinin konsantrasyonuna bağlı olmaktadır. Bu deneyimler heterozigot β -globin zincir yapısal varyantları ve α -talasemiler arasındaki hematolojik etkileşimleri yeniden ortaya koymaktadır. Pozitif yüklü β -varyantlar Hb S, C ve E, negatif yüklü hemoglobinler Hb J Baltimore ve Hb N'den daha düşük konsantrasyonlarda gösterilmektedir. Pozitif yüklü β -globin zinciri, α -globin eşleri için doğal β^A -zinciri ile başarılı olarak yarışamaz. Yükün etkisi α -talasemi varlığında artmaktadır, çünkü varyant globin sınırlı α -zincir miktarlarını aramaktadır. Yüklerine bağlı olarak anormal β -globinler, α -zincire bağlanmak için β^A -globin zincirinden daha çok ya da daha az başarılı olmaktadır. Oraklaşan hemoglobinopatilerin bir potansiyel modülatörü olarak α -talaseminin rolü ortaya çıkarılmıştır (99). α -talasemi ile orak hücre anemisi birarada bulunduğu hematolojik

veriler etkilenmektedir. Hb SS'te α -talaseminin etkileri MCHC'deki düşmeyle görülmektedir. Eritrosit içi Hb S oranı azaldığında Hb S'in polimerizasyonu ve dolayısı ile bu olaya bağlı olarak oluşan klinik tablonun şiddeti azalmaktadır (2,3,28,40,41,50,90,99,100). α -Talaseminin diğer hemoglobinopatilerle de etkileşimi vardır. Büyük bir olaslıkla Hb C traitte Hb C düzeyini düşürmektedir. α -Talaseminin Hb SC'nin klinik durumuna ve hematolojik bulgularına etkisi ya hafif derecede görülmektedir ya da etkisi yoktur. α -Talasemi, Hb AE-Barts hastalığında Hb E miktarını oldukça düşürür. α -Talasemi varlığında pozitif yüklü β -globin varyantları α -globin geni delesyonu ile orantılı olarak azalmaktadır. Negatif yüklü olanlar ise tersine artmaktadır (14, 27,47,99,100,106,109,110).

Dengesiz globin zincir sentezi talaseminin belirleyicisidir. Eritrosit proteazları bu dengeyi oluşturma çabası sırasında, artış gösteren ve birleşmeye katılmayan globinleri katabolize etmektedir. α -Globinin aşırı artışının azalmasından dolayı α -talasemi, β -talaseminin zincir dengesizliğini azaltmakta, hastalığın klinik ve hematolojik niteliklerini hafifletmektedir. İki α -globin delesyonu taşıyan heterozigot β -talasemide α : β -globin zincir oranı normal olmakta ve metrik eritrosit ölçütlerinin taşıyıcı olmayanlar için kestirme değerler vermesinin önünü tıkamaktadır (5,99). β -Talasemi taşıyıcılarında MCV ve MCH değerlerinin normal sınırlarda bulunması bir α -talasemi bileşik kalıtımına işaret etmektedir (15,112). Talasemilerin bu birlikteliği, heterozigot β talasemi tanısını zorlaştırabilmekte ve homozigot β -talasemiye ciddi, transfüzyona bağlı hastalıktan çok daha hafif talasemi intermedia fenotipine çevirebilmektedir. Bunun tam tersine, ekstra α -globin genleri ($\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\alpha$), β -talasemi traiti talasemi intermediaya dönüştürebilmektedir (84,99). Bir kromozomunda üçlü ya da dördü α -globin geni içeren olgularda α / β globin oranı artmaktadır. $\alpha^{anti 3.7}$ geninin de fonksiyonel olduğundan α -globin gen yapımı artmaktadır. Artmış α -globin geni, yeterli β -globin geni ile eşleşemediği için klinik belirti ve bulgular şiddetlenmektedir (105). -87 promoter ve codon 39 mutasyonu taşıyan β -talasemili olgularda tek gen delesyonuna bağlı α -talasemilerin birlikte kalıtımı, hematolojik verileri biraz düzeltmektedir. (35,92). ($\delta\beta$)^o-talasemi ile α -talaseminin birarada bulunması durumunda Hb F düzeyleri bundan etkilenmektedir. α -Globin geni azaldıkça Hb F düzeyi de azalmaktadır (85).

Yapılan çeşitli çalışmalar göstermiştir ki Çukurova bölgesinde hemoglobinopatiler sık görülmektedir. Bileşik heterozigot olguların buna koşut olarak artması da beklenen bir durumdur. α -Talasemi ile bileşik heterozigotluk olduğunda hematolojik veriler ve fenotip bundan kolaylıkla etkilenmektedir. α -Talasemi ile β -talasemi birarada bulunabilmektedir (5). Çalışmamızdaki bir olgu α -talasemi ile β -talasemi bileşik heterozigot kalıtımını göstermektedir. Bu olgunun MCV ve MCH değerleri düşük düzeyleri göstermektedir. Hasta fenotipi beklendiği gibi ılımlı bir seyir göstermektedir. Hb H hastalığı bululan ve ailenin ikinci kuşağından olan babadan çocuğuna α -talasemi-2 mutasyonu içeren kromozom kalıtımı olurken bir β IVS I-110 taşıyıcısı olan anneden de β -talasemi mutasyonunu içeren kromozom kalıtılmıştır (Şekil 12, Tablo 19). MCV ve Hb A₂ bulguları β -talaseminin niteliğini gösteren bu bireyde α -talasemi varlığı aile taramasının bir parçası olarak yapılan incelemede rastlantısal olarak bulunmuştur. MCV ve Hb A₂ düzeyleri β -talasemiye gösterse de hemoglobinopatilerin sık olduğu bir bölgede α -talasemilerin de araştırılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Ülkemizdeki ilk α -talasemi yayını 1979 yılında yapılan ve gen haritalama tekniğini kullanan bir çalışmaya aittir. Aksoy ve arkadaşları $\alpha^{3.7}$ delesyon tipi α -talasemi-2 ve $\alpha^{20.5}$ delesyon tipi α -talasemi-1 bileşik heterozigotluğu ile oluşan Hb H hastalığını göstermişlerdir (43). Kutlar ve arkadaşları 13 olguluk bir Hb H hastalığı serisinde α -talasemi-1 niteliğini tanımlamışlar ve 6 olguda $\alpha^{20.5}$, 4 olguda $\alpha^{MED I}$ ve 3 olguda $\alpha^{MED II}$ delesyon tipini göstermişlerdir (42). Gürgey ve arkadaşları 1989 yılında α -talasemi-1 ($\alpha^{20.5}$) homozigot hidrops fetalisi göstermişlerdir (42).

Çukurova bölgesinde Yüregir ve arkadaşları $\alpha^{3.7}$ delesyonu içeren α -talasemi-2, $\alpha^{MED II}$ delesyonu içeren α -talasemi-1 ve α -gen triplikasyonları bulunan olguları göstermişlerdir (115,117). Yüregir ve arkadaşları yaptıkları bir başka araştırmada α_2 -globin geninin poliadenilasyon uzantısında bir nokta mutasyonu tanımlamışlardır (116). Kılınç ve arkadaşları Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışmasında Hb Barts oranı ölçümü ile α -talasemi sıklığını %3.3 olarak bulmuşlardır (59). Çürük ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada $\alpha^{20.5}$ delesyon tipli α -talasemi-1'li iki olguda ciddi bir anstabil α_1 -globin varyantı olan Hb Adana'yı tanımlamışlardır (23)..

Hemoglobinopatilerin oldukça yüksek sıklıkta gözlendiği Çukurova Bölgesinde α -talasemilerin moleküler niteliği şimdiye kadar gösterilemiyordu. Gelişen tekniklerle birlikte α -talaseminin moleküler tanısı kolaylaşmıştır. Yeterli kaynağın sağlanması durumunda α -talasemi olgularının aydınlatılabilmesi hız kazanacaktır. Hematolojik verilerin normal bireylerdeki değerlere yakın olması taşıyıcı olguları bulmayı zorlaştırmaktadır. α -Talasemi taşıyıcılarının bulunması, bölge sıklığının saptanması ve α -talasemi olgularının moleküler niteliğinin gösterilebilmesi için popülasyon tarama çalışmalarına gereksinim vardır. Böylece, Hb H hastalığı gibi ciddi hastalıklar ve yaşamla bağdaşmayan Hb Barts hidrops fetalis olguları taşıyıcıların bulunması ve bilinçlendirilmesi ile olası en alt düzeye indirilebilecektir.

α -Talaseminin prenatal incelemesinde DNA analizi ilk kez 1976 yılında kullanılmıştır. Geliştirilen PCR teknikleri ile α -talasemi sendromları, Hb H hastalığı ve Hb Barts hydrops fetalisin prenatal tanısı kolaylaşmıştır (60-62,69). α -Talaseminin yaygın olduğunu düşündüğümüz bölgemizde α -talasemilerin prenatal tanısının kurumlaştırılması bir çözüm olarak görünmektedir.

Şu hedeflerin yaşama geçirilmesi toplum sağlığı açısından büyük yarar sağlayacaktır.

1. Kalıtsal kan hastalıklarının ne olduğu ve nasıl sonuçlar yarattığı konusunda toplum aydınlatılmalı ve eğitilmelidir.
2. Popülasyon taramaları planlanmalı ve eğitilmiş ekiplerle yürütülecek kan hastalıkları araştırma merkezleri oluşturulmalıdır.
3. Hasta bireylere genetik danışmanlık verilmeli, genetik danışma verecek elemanlar yetiştirilmeli ve bu amaca uygun birimler kurulmalıdır.
4. Prenatal tanı merkezleri aracılığı ile doğum öncesi tanı konularak taşıyıcı evliliklerinde hasta çocuk doğumu önlenmelidir.

SONUÇ

1. 38 kan örneği hematolojik ve moleküler açıdan incelenmiştir.
2. 4 örnekte $\alpha^{3.7}$ delesyon tipine bağlı olarak α -talasemi-2,
3. 1 örnekte $\alpha^{20.5}$ delesyon tipine bağlı olarak α -talasemi-1,
4. 3 örnekte α -talasemi-1 ve α -talasemi-2 bileşik kalıtımı ile oluşan Hb H hastalığı,
5. α -Talasemi-2 saptanan bir örnekte β -talasemi (IVS I-110) bileşik kalıtımı,
6. 5 örnekte β IVS I-110 mutasyonu,
7. Moleküler düzeyde anormalliği bulunmayan MCV düzeyi düşük ve Hb A₂ düzeyi normal olan 6 örnekte ferritin düzeyi 36 ng/mL'nin altında,
8. Hb H hastalarında ferritin düzeyi 180 ng/mL'den yüksek olarak,
9. MCV düzeyi 95 fL'den yüksek olan iki örnekte alfa talasemi taşıyıcısı olanında vitamin B₁₂ ve folik asit düzeyi, diğerinde vitamin B₁₂ düzeyi düşüklüğü bulunmuştur.

ÖZET

α -Talasemi, α -globin zincirindeki delesyon ya da mutasyonlarla oluşmaktadır. Moleküler incelemeler α -talasemilerin çoğunlukla α -globin gen kümesindeki çeşitli DNA segmentlerinin delesyonlarıyla oluştuğunu göstermektedir. Bu kalıtsal kan hastalığı Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ve Güneydoğu Asya ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir. Çukurova Bölgesinde α -talasemi sıklığı % 3.3 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada Çukurova Bölgesinde görülen α -talasemilerin moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

İçel iline bağlı bir köyden alınan örnekler Coulter Counter kan sayacı ile hematolojik yönden incelenmiştir. Daha sonra Hb A₂, Hb F düzeyleri ölçülmüş ve hemoglobin elektroforezleri yapılmıştır. Hb A₂ düzeyi %3.7'den yüksek ve MCV düzeyi 79 fL'den düşük olgularda β -gen mutasyonları ARMS yöntemi ile incelenmiştir. Örneklerin 31'inde serum ferritini ölçülmüştür. Alfa gen delesyonları uygun primerler kullanılarak PCR ile incelenmiştir. MCV düzeyi yüksek bulunan örneklerde vitamin B₁₂ ve folat düzeyi çalışılmıştır.

MCV düzeyi düşük örneklerden Hb A₂ düzeyi %3.7'den yüksek bulunan 5 örnekte β -gen mutasyonu (IVS I-110) bulunmuştur. MCV düzeyi düşük olup α - ve/veya β -gen mutasyonu bulunmayan örneklerin ferritin düzeyi 36 ng/mL ve altında bulunmuştur.

Aynı ailenin sekiz bireyinde delesyonel α -talasemiler bulunmuştur. Dört bireyde $\alpha^{3.7}$ delesyon tipi ile olan α -talasemi-2, bir bireyde $\alpha^{20.5}$ delesyon tipi ile olan α -talasemi-1 ve üç bireyde α -talasemi-2 ve α -talasemi-1 bileşik kalıtımı ile olan Hb H hastalığı bulunmuştur. α -Talasemi-2 saptanan örneklerin birinde β -gen mutasyonu (IVS I-110) bileşik kalıtımı da bulunmuştur. Bu mutasyon anneden ve $\alpha^{3.7}$ delesyonu ise babadan gelmektedir.

Anahtar Sözcükler:

α -talasemi-2, α -talasemi-1, Hb H hastalığı, α -talasemi ve β -talasemi, PCR.



SUMMARY

α -Thalassemia is occurred by deletion or mutation of α -globin genes. Molecular investigation showed that α -thalassemias are most frequently caused by deletion of various segments of DNA from the α -globin gene cluster. This inherited blood disease is common in Mediterranean Countries, the Middle East, India and Southeast Asia. It was reported that frequency of α -thalassemia in Çukurova region is 3.3%. The aim of this study is investigating of α -thalassemia at molecular level, in Çukurova region.

The samples which were collected from a village of İçel, were analyzed hematologically by Coulter Counter. Then, levels of Hb A₂ and Hb F were measured and their hemoglobin electrophoresis' were done. β -gen mutations were investigated by ARMS method in the cases who had higher Hb A₂ level than 3.7% and lower MCV level than 79 fL. It was measured serum ferritin level in 31 samples. Deletions of α -gene were performed with using of specific primers by PCR. Vitamin B₁₂ and folic acid levels were studied in the samples which had high level of MCV.

β -gen mutation was found in 5 samples who had low MCV level and higher Hb A₂ level than 3.7%. Ferritin level was found lower than 36 ng/mL in samples who had low MCV level and had not α - and/or β -gen mutations.

Deletional α -thalassemias were found in eight individuals of same family. In four individuals were found α -thalassemia-2, in one was found α -thalassemia-1 and in three individuals were found Hb H disease which had compound heterozygous of α -thalassemia-1 and α -thalassemia-2. It was also found β -gen mutation in a case of α -thalassemia-2. This mutation was come from his mother and $\alpha^{3.7}$ deletion was come from his father.

Key Words:

α -thalassemia-1, α -thalassemia-2, Hb H disease, α -thalassemia and β -thalassemia, PCR.



KAYNAKLAR

1. Abdo Z: Hb Setif [α 94(G1)Asp→Tyr] in a Saudi Arabian family. **Hemoglobin** 1989; 13:737-742.
2. Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, McKie K, Clary A: Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am J Hematol** 1994; 45:279-282.
3. Adekile AD, Huisman THJ: Level of fetal hemoglobin in children with sickle cell anemia: influence of gender, haplotype and α -thalassemia-2 trait. **Acta Haematol** 1993; 90:34-38.
4. Advani R, Sorensan S, Shinar E, Lande W, Rachmilewitz E, Schrier SL: Characterization and comparison of the red cell membrane damage in severe human α - and β -thalassemia. **Blood** 1992; 79:1058-1063.
5. Akerman BR, Fujiwara TM, Lancaster GA, Morgan K, Scriver CR: Identification of deletion and triple α -globin gene haplotypes in the Montreal β -thalassemia Screening Program: implications for genetic medicine. **Am J Med Gen** 1990; 36:76-84.
6. Aksoy M: Hemoglobinopathies in Turkey. **Hemoglobin** 1985; 9:209-216.
7. AL-Saleh AA, Hussain S: Alpha thalassemia in Saudis. **Acta Haematol** 1992; 88:165-169

8. Bardakdjian-Michau J, Rosa J, Galacteros F, Lancelot M, Marquart FX: Hb Reims [$\alpha_223(\text{B4})\text{Glu}\rightarrow\text{Gly}\beta_2$]: a new variant with slightly decreased stability. **Hemoglobin** 1989; 13:733-735.
9. Baysal E, Huisman THJ: Detection of common deletional α -thalassemia-2 determinants by PCR. **Am J Hematol** 1994; 46:208-213.
10. Baysal E: Novel and current molecular diagnostic in hemoglobinopathies. In Ulutin O (Ed): **Lectures of XIIIth Meeting of The International Society of Haematology**, Istanbul, Türkiye, 1995; pp:66-70.
11. Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR: A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α thalassemia. **Br J Haematol** 1992; 81:104-108.
12. Brennan SO, Lowrey IR, Harris MG, Rodwell R, Zarkos K, Wilkinson T, Yakas J, Kronenberg H: Hb J-Camaguey [$\alpha141(\text{H3})\text{Arg}\rightarrow\text{Gly}$] associated with α -thalassemia-1 in an Australian family. **Hemoglobin** 1991; 15:303-307.
13. Brozovic M, Henthorn J: Investigation of abnormal haemoglobins and thalassemia. In Dacie JV, Lewis SM (eds), **Practical Haematology**, 8th ed, Hong Kong, ELBS with Churchill Livingstone 1994; pp:249-286.
14. Bunn F: Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. **Blood** 1987; 69:1-6.
15. Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R: Thalassemias in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention. **Am J Pediatr Hematol Oncol** 1991; 13:179-188.

16. Chang JG, Liu TC, Perng LI, Chiou SS, Chen JP, Chen PH, Lin CP: Rapid molecular characterization of Hb H disease in Chinese by polymerase chain reaction. **Ann Hematol** 1994; 68:33-37.
17. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen PH, Chen CP: Rapid diagnosis of α -thalassemia-1 of Southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. **Blood** 1991; 78:853-854.
18. Chen TP, Lin SF, Chang JG, Tsao CJ, Liu TC, Chiou SS, Liu HW: Molecular characterization of Hb H disease by polymerase chain reaction. **Acta Haematol** 1993; 90:177-181.
19. Chinprasertsuk S, Wanachiwanawin W, Piankijagum A: Effect of pyrexia in the formation of intraerythrocytic inclusion bodies and vacuoles in haemolytic crisis of haemoglobin H disease. **Eur J Haematol** 1994; 52:87-91.
20. Codrington JF, Codrington FA, Wisse JH, Wilson JB, Webber BB, Wong SC, Huisman THJ: Hb Chad or $\alpha_223(\text{B4})\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}\beta_2$ observed in members of a Surinam family in association with α -thalassemia-2 and with Hb S. **Hemoglobin** 1989; 13:543-556.
21. Connor JM, Ferguson-Smith MA: **Essential Medical Genetics**, 2nd ed, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987.
22. Çürük MA, Baysal E, Gupta RB, Sharma S, Huisman THJ: An IVS-I-117 (G \rightarrow A) acceptor splice site mutation in the $\alpha 1$ -globin gene is a nondeletional α -thalassemia-2 determinant in an Indian population. **Br J Haematol** 1993; 85:148-152.
23. Çürük MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TF, Webber BB, Altay Ç, Gürgey A, Huisman THJ: Hb Adana or $\alpha_259(\text{E8})\text{Gly}\rightarrow\text{Asp}\beta_2$, a severely

- unstable α_1 -globin variant, observed in combination with the $-(\alpha)20.5$ kb α -thal-1 deletion in two Turkish patients. **Am J Hematol** 1993; 44:270-275.
24. Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R: Locus assignment of human α -globin mutations by selective amplification and direct sequencing. **Br J Haematol** 1990; 76:275-284.
25. Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J: Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by amplification analysis. **Br J Haematol** 1992; 82:105-111.
26. Eisenstein B: The polymerase chain reaction. **N Eng J Med** 1990; 322:178-181.
27. Embury SH, Kropp GL, Stanton TS, Warren TC, Cornett PA, Chehab FF: Detection of the hemoglobin E mutation using the color complementation assay: application to complex genotyping. **Blood** 1990; 76:619-623.
28. Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis Jr JR, Kleman KM, Preisler H, Vichinsky E, Lande WN, Lubin BH, Kan YW, B. M, Sc. D, S. FR, Mentzer WC: Concurrent sickle-cell anemia and α -thalassemia. **N Eng J Med** 1982; 306:270-274.
29. Fairbanks VF, Klee GG: Biochemical aspects of hematology. In Butis CA, Ashwood ER (Eds): **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 2nd ed, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1994; pp:1974-2072.
30. Fei YJ, Öner R, Bozkurt G, Gu LH, Altay Ç, Gürgey A, Fattoum S, Baysal E, Huisman THJ: Hb H disease caused by a homozygosity for the AATAAA \rightarrow AATAAG mutation in the polyadenylation site of the α_2 -globin gene: hematological observations. **Acta Haematol** 1992; 88:82-85.

31. Fei YJ, Liu JC, Jogessar VB, Westermeyer KR, Bridgemohan R, Huisman THJ: Combinations of three different forms of α -thalassemia in a large Indian family from Durban, South Africa: hematological observations. **Acta Haematol** 1992; 87:11-15.
32. Flint J, Harding RM, Clegg JB, Boyce AJ: Why are some genetic diseases common? **Hum Genet** 1993; 91:91-117.
33. Fodde R, Harteveld CL, Losekoot M, Giordano PC, Meera Khan P, Nayudu NVS, Bemini LF: Multiple recombination events are responsible for the heterogeneity of α^+ -thalassemia haplotypes among the forest tribes of Andra Pradesh, India. **Ann Hum Genet** 1991; 55:43-50.
34. Galanello R, Aru B, Dessi C, Addis M, Paglietti E, Melis MA, Cocco S, Massa P, Giagu N, Barella S, Turco MP, Maccioni L, Cao A: Hb H disease in Sardinia: molecular, hematological and clinical aspects. **Acta Haematol** 1992; 88:1-6.
35. Galanello R, Dessi E, Melis MA, Addis M, Sanna MA, Rosatelli C, Argiolu F, Giagu N, Turco MP, Cacace E, Pirastu M, Cao A: Molecular analysis of β^0 -thalassemia intermedia in Sardinia. **Blood** 1989; 74:823-827.
36. Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AOM, Buckle VJ, Higgs DR: X-linked α -thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. **Am J Hum Genet** 1992; 51:1136-1149.
37. Gonzalez-Redondo JM, Gilsanz F, Ricard P: Characterization of a new α -thalassemia-1 deletion in a Spanish family. **Hemoglobin** 1989; 13:103-116.
38. Green DW, Walters L, Ackerman Jr NB: Pathological cases of the month: Bart's hemoglobin hydrops fetalis syndrome. **Arch Pediatr Adolesc Med** 1994; 148:283-284.

39. Gu YC, Gu LH, Wilson JB, Cepreganova B, Ramanchandran M, Walker ELD, Huisman THJ, Potitong P: Hb Westmead [α 122(H5)His \rightarrow Gln], Hb E [β 26(B8)Glu \rightarrow Lys], and α -thalassemia-2 (3.7 Kb deletion) in a Laotian family. *Hemoglobin* 1991; 15:297-302.
40. Gu LH, Wilson JB, Molchanova TP, McKie KM, McKie VC, Huisman THJ: Three sickle cell anemia patients each with a different α -chain variant, diagnostic complications. *Hemoglobin* 1993; 17:295-301.
41. Gupta AK, Kirchner KA, Nicholson R, Adams III JG, Schechter AN, Noguchi CT, Steinberg MH: Effects of α -thalassemia and sickle polymerization tendency on the urine-concentrating defect of individuals with sickle cell trait. *J Clin Invest* 1991; 88:1963-1968.
42. Gürgey A, Altay Ç, Beksaç MS, Bhattacharya R, Kutlar F, Huisman THJ: Hydrops fetalis due to homozygosity for α -thalassemia-1, $-(\alpha)20.5$ kb: the first observation in a Turkish family. *Acta Haematol* 1989; 81:169-171.
43. Gürgey A: Talasemi ve hemoglobinopatilerde yeni görüşler. Ankara, TÜBİTAK TAG, 1986.
44. Hall GW, Thein SL, Newland AC, Chisholm M, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kattamis C, Higgs DR: A base substitution (T \rightarrow C) in codon 29 of the α 2-globin gene causes α -thalassemia. *Br J Haematol* 1993; 85:546-552.
45. Hall GW, Higgs DR, Murphy P, Villegas A, De Miguel A: A mutation in the poliadenilation signal of the α 2-globin gene (AATAAA \rightarrow AATA-) as a cause of α thalassemia in Asian Indians. *Br J Haematol* 1994; 88:225-227.

46. Hatton CSR, Wilkie AOM, Drysdale HC, Wood WG, Vickers MA, Sharpe J, Ayyub H, Pretorius IM, Buckle VJ, Higgs DR: α -Thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human α -globin gene cluster. **Blood** 1990; 76:221-227.
47. Hendy JG, Cauchi MN: Hb I-Toulouse [β 66(E10)Lys \rightarrow Glu] in association with α -thalassemia. **Hemoglobin** 1994; 18:227-229.
48. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ: A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. **Blood** 1989; 73:1081-1104.
49. Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Vickers MA, Wilkie AOM, Lamb J, Vyas P, Bennet JP: The α -thalassemias. **Ann N York Acad Sci** 1991; 15-22.
50. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason KP, Serjeant BE, Serjeant GR: The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N Eng J Med** 1982; 306:1441-1446.
51. Huisman THJ: α -Globin chain repository. **Hemoglobin** 1994; 18:77-183.
52. Huisman THJ: Introduction and review of standard methodology for the detection of hemoglobin abnormalities, In Huisman THJ (ed), **The Hemoglobinopathies (Methods in Hematology)**, First Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1986, pp:15-16.
53. Hundrieser J, Sanguansemsri T, Laig M, Pape M, Künhau W, Flatz G: Direct demonstration of the Hb Suan-Dok mutation in the α 2-globin gene by restriction analysis with SMA I. **Hemoglobin** 1990; 14:69-77.

54. Hundrieser J, Laig M, Yongvanit P, Sriboonlue P, Sanguansemsri T, Kühnau W, Pape M, Flatz G: Study of alpha-thalassemia in Northeastern Thailand at the DNA level. **Hum Hered** 1990; 40:85-88.
55. Innis MA, Gelfand DH: Optimization of PCRs. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). **PCR Protocols**, Academic Press Inc, San Diego, 1990; pp:3-12.
56. Jauniaux E, Maldergem LV, De Munter C, Moscoso G, Gillerot Y: Nonimmune hydrops fetalis with genetic abnormalities. **Obstet Gynaecol** 1990; 75:568-571.
57. Karlsson S, Nienhuis AW: Developmental regulation of human globin genes. **Ann Rev Biochem** 1985; 54:1071-1108.
58. Kazazian Jr HH: The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Semin Hematol** 1990; 27:209-228.
59. Kılınc Y, Kümi M, Gürgey A, Altay Ç: Adana Bölgesi'nde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa-talasemi i glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. **Doğa J Med Sci** 1986; 10:162-167.
60. Ko TM, Tseng LH, Hsieh FJ, Hsu PM, Lee TY: Carrier detection and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia of Southeast Asian deletion by polymerase chain reaction. **Hum Genet** 1992; 38:245-248.
61. Ko TM, Tseng LH, Hsieh FJ, Lee TY: Prenatal diagnosis of Hb H disease due to compound heterozygosity for South-East Asian deletion and Hb Constant Spring by polymerase chain reaction. **Prenat Diagn** 1993; 13:143-146.
62. Ko TM, Hsieh FJ, Hsu PM, Lee TY: Molecular characterization of severe α -thalassemias causing hydrops fetalis in Taiwan. **Am J Med Genet** 1991; 39:317-320.

63. Kohn J: Separation of hemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Pathol** 1969; 22:109-110.
64. Kropp GL, Fucharoen S, Embury SH: Selective enzymatic amplification of α_2 -globin DNA for detection of the hemoglobin Constant Spring mutation. **Blood** 1989; 73:1987-1992.
65. Kutlar F, Reese AL, Hsia YE, Kleman KM, Huisman THJ: The types of hemoglobins and globin chains in hydrops fetalis. **Hemoglobin** 1989; 13:671-683.
66. Kutlar A, Huisman THJ: Detection of hemoglobinopathies. Hommes FA (ed), **Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics, A Laboratory Manual**, J. Wiley & Sons Inc, New York, 1991; pp:519-560.
67. Lam TK, Chan V, Fok TF, Li CK, Feng CS: Long-term survival of a baby with homozygous alpha-thalassemia-1. **Acta Haematol** 1992; 88:198-200.
68. Lamb J, Harris PC, Wilkie AOM, Wood WG, Dauwerse JHG, Higgs DR: De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the α -thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-16). **Am J Hum Genet** 1993; 52:668-676.
69. Lebo RV, Saiki RK, Swanson K, Montano MA, Erlich HA, Golbus MS: Prenatal diagnosis of α -thalassemia by polymerase chain reaction and dual restriction enzyme analysis. **Hum Genet** 1990; 85:293-299.
70. Liang R, Liang S, Jiang NH, Wen XJ, Zhao JB, Nechtman JF, Stoming TA, Huisman THJ: α and β thalassemia among Chinese children in Guangxi Province, P.R. China: molecular and haematological characterization. **Br J Haematol** 1994; 86:351-354.
71. Liebhaber SA: α -Thalassemia. **Hemoglobin** 1989; 13:685-731.

72. Lin CK, Yang ML, Jiang ML, Chien CC, Lin HH, Peng HW: Comparison of two screening methods, modified Hb H preparation and the osmotic fragility test, for alpha-thalassemic traits on the basis of gene mapping. *J Clin Lab Anal* 1991; 5:392-395.
73. Lin SF, Liu CL, Chen TP, Chiou SS, Liu HW, Chang JG: Diagnosis of thalassemia by non-isotope detection of α/β and ζ/α mRNA ratios. *Br J Haematol* 1994; 87:133-138.
74. Liu TC, Chiou SS, Lin SF, Chen TP, Tseng WP, Chen PH, Chang JG: Molecular basis and hematological characterization of Hb H disease in Southeast Asia. *Am J Hematol* 1994; 45:293-297.
75. Lobel JS, Cameron BF, Johnson E, Smith D, Kalinyak K: Value of screening umbilical cord blood for hemoglobinopathy. *Pediatrics* 1989; 83:823-826.
76. Loukopoulos D: Thalassemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol* 1991; 62:85-94.
77. Lukens JH: The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In Lee GR et al (eds); *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th ed Philadelphia, Lea & Febiger, 1993; pp:1102.
78. Makonkawkeyoon L, Sanguansersri T, Asato T, Nakashima Y, Takei H: Rapid detection of chain termination mutations in the $\alpha 2$ globin gene. *Blood* 1993; 82:3503-3512.
79. Molchanova TP, Pobedimskaya DD, Huisman THJ: The differences in quantities of $\alpha 2$ - and $\alpha 1$ -globin gene variants in heterozygotes. *Br J Haematol* 1994; 88:300-306.

80. Molchanova TP, Pobedimskaya DD, Postnikov YV: A simplified procedure for sequencing amplified DNA containing the $\alpha 2$ - or $\alpha 1$ -globin gene. **Hemoglobin** 1994; 18:251-255.
81. Muglia M, Annesi G, Gabriele AL, Covello M, Brancati C: α -Thalassemia in a Southern Italian population (Detection by a non-radioactive procedure). **Hemoglobin** 1993; 17:285-287.
82. Nakashima H, Fujiyama A, Kagiyama S, Imamura T: Genetic polymorphisms of gene conversion within the duplicated human α -globin loci. **Hum Genet** 1990; 84:568-570.
83. Novelietto A, Hafez M, Di Rienzo A, Felicetti L, Deidda G, El Morsi Z, Al-Tonbary Y, El-Ziny M, Abd-El-Gelil M, Terrenato L: Frequency and molecular types of deletional α -thalassemia in Egypt. **Hum Genet** 1989; 81:211-213.
84. Oron V, Filon D, Oppenheim A, Rund D: Severe thalassemia intermedia caused by interaction of homozygosity for α -globin gene triplication with heterozygosity for β thalassemia. **Br J Haematol** 1994; 86:377-379.
85. Öner C, Gürgey A, Altay Ç, Kutlar F, Huisman THJ: Variation in the level of fetal hemoglobin in $(\delta\beta)^0$ -thalassemia heterozygotes with different numbers of α -globin genes. **Am J Hematol** 1990; 34:230-231.
86. Peng HW, Choo KB, Ho CH, Yen MS, Liung WY, Lin CK, Yang ZL, Ng HT, Ching KN, Han SH: Arrangements of α -globin cluster in Taiwan. **Acta Haematol** 1989; 82:64-68.
87. Petrou M, Brugiarelli M, Old J, Hurley P, Ward RHT, Wong KP, Rodeck C, Modell B: Alpha thalassemia hydrops fetalis in the UK: the importance of screening pregnant women of Chinese, other South East Asian and Mediterranean extraction for alpha thalassemia trait. **Br J Obstet Gynaecol** 1992; 99:985-989.

88. Poncz M, Solowiejzk D, Harpel D, Mory Y, Schwartz E, Surrey S: Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood. Analysis of β -like globin genes. **Hemoglobin** 1982; 6:27-36.
89. Ramoa L, Cash F, Weiss I, Liebhaber S, Pirastu M, Galanello R, Loi A, Paglietti E, Ioannou P, Cao A: Human α -globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the ζ -globin gene. **Hum Genet** 1992; 89:323-328.
90. Rogers ZR, Powars DR, Kinney TR, Williams WD, Schroeder WA: Nonblack patients with sickle cell disease have African β^S gene cluster haplotypes. **Jama** 1989; 261:2991-2994.
91. Romao L, Olim G, Martins MC, Rodrigues V, Coutinho-Gomez MP, Lavinha J: Unusual molecular basis of Hb H disease in the Azores Islands, Portugal. **Hemoglobin** 1990; 14:607-616.
92. Rosatelli C, Oggiano L, Leoni GB, Tuveri T, Di Tucci A, Scales MT, Dore F, Pistidda P, Massa A, Longinotti M, Cao A: Thalassemia intermedia resulting from a mild β -thalassemia mutation. **Blood** 1989; 73:601-605.
93. Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N: Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. **Blood** 1989; 74:2194-2202.
94. Shalmon L, Kirschmann C, Zaizov R: A new deletional α -thalassemia detected in Yemenites with hemoglobin H disease. **Am J Hematol** 1994; 45:201-204.
95. Shinar E, Rachmilewitz EA: Differences in the pathophysiology of hemolysis of α - and β -thalassemic red blood cells. **Ann N Y Acad Sci** 1991; 118-126.

96. Shinar E, Rachmilewitz EA, Lux SE: Differing erythrocyte membrane skeletal protein defects in alpha and beta thalassemia. **J Clin Invest** 1989; 83:404-410.
97. Skogerboe KJ, West SF, Smith C, Terashita ST, LeCrone CN, Detter JC, Tait Jf: Screening for α -thalassemia. **Arch Pathol Lab Med** 1992; 116:1012-1018.
98. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF: High prevalence of α -thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin** 1991; 15:309-311.
99. Steinberg MH: The interactions of α -thalassemia with hemoglobinopathies. **Hematol Oncol Clin North Am** 1991; 5:453-473.
100. Steinberg MH, Embury SH: α -Thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood** 1986; 68:985-990.
101. Tan JAMA, Tay JSH, Soemantri A, Kham SKY, Wong HB, Lai PS, Saha N: Deletional types of alpha-thalassemia in Central Java. **Hum Hered** 1992; 42:289-292.
102. Tang W, Luo HY, Eng B, Waye JS, Chui DHK: Immunocytological test to detect adult carriers of ($-^{SEA}$) deletional α -thalassemia. **Lancet** 1993; 342:1145-1147.
103. Tang W, Luo HY, Albitar M, Patterson M, Eng B, Waye JS, Liebhaber SA, Higgs DR, Chui DHK: Human embryonic ζ -globin chain expression in deletional α -thalassemias. **Blood** 1992; 80:517-522.
104. Tanrıverdi K: **β -Talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi.** Bilim Uzmanlığı tezi, Adana, Ç Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.

105. Thompson CC, Ali MAM, Vacovsky M, Boyadjian S: The interaction of anti 3.7 type quadruplicated α -globin genes and heterozygous β -thalassemia. *Hemoglobin* 1989; 13:125-135.
106. Thonglariyam V, Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P: The molecular basis of AE-Bart's disease. *Hemoglobin* 1989; 13:117-124.
107. Tsintsof AS, Hertzberg MS, Prior JF, Mickleson NP, Trent RJ: α -Globin gene markers identify genetic differences between Australian aborigines and Melanesians. *Am J Hum Genet* 1990; 46:138-143.
108. Villegas A, Sanchez J, Ricard P, Gonzalez FA, Del Potro E, Armada B, Carreno DL, Espinos D: Characterization of a new α -thalassemia-1 mutation in a Spanish family. *Hemoglobin* 1994; 18:29-37.
109. Warkentin TE, Barr R, Ali MAM, Mohandas N: Recurrent acute splenic sequestration crisis due to interacting genetic defects: hemoglobin SC disease and hereditary spherocytosis. *Blood* 1990; 75:266-270.
110. Weatherall DJ: The thalassemias. In Williams WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman MA (eds), *Hematology*, 4th ed, New York, McGraw-Hill Publishing Company, 1990, pp:510-539.
111. Weiss I, Cash FE, Coleman MB, Pressley A, Adams JG, Sanguansem Sri T, Liebhaber SA, Steinberg MH: Molecular basis for α -thalassemia associated with the structural mutant hemoglobin Suan-Dok ($\alpha 2^{109\text{Leu}\rightarrow\text{Arg}}$). *Blood* 1990; 76:2630-2636.
112. White JM, Christie BS, Nam D, Daar S, Higgs DR: Frequency and clinical significance of erythrocyte genetic abnormalities in Omanis. *J Med Genet* 1993; 30:396-400.

113. Wilkie AOM, Buckle VJ, Harris PC, Lamb J, Barton NJ, Reeders ST, Lindenbaum RH, Nicholis RD, Barrow H, Bethlenfalvay NC, Hutz MH, Tolmie JL, Weatherall DJ, Higgs DR: Clinical features and molecular analysis of the α thalassaemia/mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. **Am J Genet** 1990; 46:1112-1126.
114. Youwen H, Letian Z, Rongxin W, Jidong S, Nijia Z, Liming W, Junwu Z, Guanyun W, Shenwu W, Yu F, Xu L, Qi L, Peng Z, Guifang L, Rong L: First trimester prenatal diagnosis of severe α -thalassaemia. **Birt Defects: Original Artical Series** 1988; 23:455-463.
115. Yüregir GT, Aksoy K, Dikmen N: Alfa talasemi taramasında tek tüp osmotik frajilitenin yeri. **Doğa Tr J Med Sci** 1990; 14:374-380.
116. Yüregir GT, Aksoy K, Çürük MA, Dikmen N, Fei YJ, Baysal E, Huisman THJ: Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional α -thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. **Br J Hematol** 1992; 80:527-532.
117. Yüregir GT, Kutlar F, Kutlar A, Aksoy M, Huisman THJ: Incidence and types of β -thalassaemia mutatiuous in South Turkey. **Ç Ü Tıp Fak Der** 1989; 1:111-115.
118. Zhao JB, Zhao L, Fei YJ, Liu JC, Huisman THJ: A novel α -thalassaemia-2 (-2.7 kb) observed in a Chinese patient with Hb H disease. **Am J Hematol** 1991; 38:248-249.