



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDE BETA
TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA BETA
GLOBİN GEN MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Deniz İLGÜN GÜREL

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL

AYDIN-2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDE BETA
TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA BETA
GLOBİN GEN MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Deniz İLGÜN GÜREL

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL

AYDIN-2020

TEŞEKKÜR

Asistanlık dönemimin tamamında yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zaman çalışmaya ve araştırmaya teşvik eden, bilgi ve deneyimlerini paylaşan tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL'a,

Uzmanlık eğitimimde büyük emeği geçen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Fahriye TOSUN ve tüm hocalarıma,

Asistanlık eğitimim süresince desteklerini hissettiğim Dr. Besim HACIOĞU ve Dr. Deniz ÇARDAK başta olmak üzere asistan arkadaşlarıma,

Birlikte çalıştığımız hemşire, sekreter ve personel ekibine,

En yakın arkadaşlarım İpek DÜZGÖREN ve Gülce ATILGAN'a,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Uzm. Dr. Yunus GÜREL'e,

Beni yetiştiren büyüten ve desteklerini her zaman arkamda hissettiğim annem Türkan İLGÜN ve babam Orhan İLGÜN'e çok teşekkür ederim.

Dr. Deniz İLGÜN GÜREL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
EKLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hemoglobin	3
2.1.1. Hemoglobin Yapı ve İşlevi.....	3
2.1.2. Hemoglobin Sentezi	5
2.2. Talasemiler	6
2.2.1. Tanım.....	6
2.2.2. Dünyada Beta Talasemi Epidemiyolojisi	7
2.2.3. Türkiye’de Beta Talasemi Epidemiyolojisi.....	7
2.2.4. Beta Talasemide Genetik.....	7
2.2.4.1. <i>Gen delesyonları</i>	10
2.2.4.2. <i>Transkripsiyonel mutasyonlar</i>	10
2.2.4.3. <i>RNA processing mutasyonları</i>	10
2.2.4.4. <i>RNA translasyon mutasyonları</i>	11
2.2.4.4.1. <i>Anlamsız mutasyonlar</i>	11
2.2.4.4.2. <i>Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları</i>	11
2.2.4.5. <i>Beta globin gen ailesi</i>	12
2.2.5. Beta Talasemi Patofizyolojisi.....	12
2.2.6. Beta Talasemide Klinik	13

2.2.7. Beta Talasemi Ayırıcı Tanısı.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR.....	43
ÖZET	45
ABSTRACT	47
KAYNAKLAR.....	49
EKLER	58

TABLO DİZİNİ

Tablo I. Hemoglobin tipleri	4
Tablo II. Hb, Hct ve MCV değerlerinin yaş gruplarına göre ortalama ve alt sınır değerleri.....	18
Tablo III. Tam kan sayımı parametreleri ve elektroforez sonuçları.....	24
Tablo IV. Beta talasemi taşıyıcılarında mutasyon dağılımı ve sıklığı.....	24
Tablo V. Mutasyonlara göre cinsiyet dağılımı	25
Tablo VI. Mutasyonlara göre hemoglobin düzeyleri.....	25
Tablo VII. Mutasyonlara göre hematokrit düzeyleri.....	26
Tablo VIII. Mutasyonlara göre kırmızı küre sayısı düzeyleri	26
Tablo IX. Mutasyonlara göre MCV düzeyleri.....	27
Tablo X. Mutasyonlara göre MCH düzeyleri	27
Tablo XI. Mutasyonlara göre MCHC düzeyleri	28
Tablo XII. Mutasyonlara göre trombosit sayısı düzeyleri.....	28
Tablo XIII. Mutasyonlara göre RDW dağılımı.....	29
Tablo XIV. Mutasyonlara göre HbA2 dağılımı.....	29
Tablo XV. Mutasyonlara göre HbF düzeyleri	30
Tablo XVI. RDW indeksine göre mutasyonların dağılımı.....	30
Tablo XVII. Mutasyonların HbF ile olan ilişkisi	31
Tablo XVIII. Mutasyonların Mentzer indeksi ile ilişkisi.....	32
Tablo XIX. Mutasyonların illere göre dağılımı	32
Tablo XX. Mutasyonlar ve gerçekleştikleri gen bölgeleri.....	33
Tablo XXI. Hastaların Hb, MCV ve RBC değerlerinin dağılımı.....	34
Tablo XXII. HbA2 düzeyi normal ya da yüksek olan hastaların dağılımı.....	34
Tablo XXIII. RDW düzeylerine göre hastaların dağılımı.....	34

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Hemoglobinin genel yapısı	3
Şekil 2. Hemoglobin molekülü.....	4
Şekil 3. İnsan globin genleri arasındaki zamanla olan değişiklik	6
Şekil 4. Beta talasemi mutasyonlarının dünyada dağılımı	11
Şekil 5. İnsan beta globin gen ailesi yapısı	12
Şekil 6. Cinsiyete göre hastaların dağılımı.....	23



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BTT	: Beta talasemi taşıyıcılığı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Fe⁺²	: Demir
Hb	: Hemoglobin
HCT	: Hematokrit
HPLC	: Yüksek performanslı likit kromatografisi
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
Mİ	: Mentzer İndeksi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PLT	: Trombosit sayısı
RBC	: Eritrosit sayısı
RDW	: Eritrosit dağılım genişliği
RNA	: Ribonükleik asit
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
ζ	: Zeta

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Etik Kurul Onay Formu	58
Ek 2. Olgu-Rapor Formu	59



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi bir ya da daha fazla globin zincir (α , β , δ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$) sentezinin azalması ile karakterize bir hemoglobin (Hb) bozukluğudur (1). Globin zincirinin yapımının azalması ya da yapılamamasına bağlı olarak ortaya çıkan talasemiler alfa (α) ve beta (β) talasemilerdir (2).

Talasemiler dünyada en yaygın görülen tek gen hastalığıdır. Hemolitik anemi, mikrositoz ile karakterizedir ve otozomal resesif geçiş gösterir. Dünya üzerinde yaklaşık 270 milyon talasemi taşıyıcısı bulunmaktadır (1). Genel olarak iki tip beta talasemi vardır; β^0 ve β^+ . Nadiren bu iki allelden daha hafif seyreden bir form da β^{++} olarak gösterilmekte ve β zincir üretiminde minimal eksikliğe yol açmaktadır. Beta talasemi taşıyıcıları (BTT) klinik olarak asemptomatiktir. Türkiye genelinde yapılan çalışmalar nüfusumuzun ortalama %2.1'inin BTT olduğunu ve bu oranın bazı bölgelerde %10'u bulunduğunu ortaya koymaktadır (3,4). Heterozigotlar çok çeşitli olabilmektedir. β^0 talasemi tipine sahip bireylerin ortalama eritrosit hacmi (MCV) değerlerinin β^+ tipine sahip olanlardan daha düşük seyrettiği gösterilmiştir (5). Heterozigot talasemi olgularında HbA₂ gibi HbF düzeyleri de mutasyon tiplerine göre farklılık göstermektedir. HbF değerleri β^0 grubunda yapılan çalışmalarda daha yüksek olarak bulunmuştur (1).

Tam kan sayımı ve periferik kan yayması incelemesi özellikle anemili hastaların ilk değerlendirilmesinde, ayırıcı tanısında ve daha sonra istenecek olan testlerin seçiminde yönlendirici, basit ve hızlı sonlanan testlerdir. Bunlara ek olarak eritrosit indeksleri, hemoglobin elektroforezi gibi hematolojik testler de kullanılmaktadır. Ayrıca MCV, eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin miktarı (MCH) ve Hb hemoglobinopati taraması için oldukça kullanışlı değişkenlerdir. Talasemi tanısı için elektroforez testleri ile Hb oranları, tipleri ve anormal Hb'nin gösterilmesi gerekmektedir (2).

Beta globin geni oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir genidir. 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5) β -globin gen kümesi içinde yer alır. β -globin geninde Hb'e giden yol üzerinde meydana gelen mutasyonlar β -talasemiye, orak hücreli anemiye ya da anormal bir Hb'e neden olma potansiyeline sahiptir (6). β -globin gen mutasyonlarının ortaya çıkarılması β -talasemi erken prenatal tanısı ya da heterozigot

bireyleri içeren taşıyıcıların belirlenmesi ve tedavi projeleri için gereklidir (2). BTT’de genotipin fenotip üzerine etkisinin kaçınılmaz olduğu düşünülmektedir.

Toplumdaki talasemi taşıyıcıları normal görünümde olduklarından özel talasemi testleri yapılmadıkça talasemi taşıyıcısı olup olmadıkları anlaşılabilir. Talasemi riskinin yüksek olduğu bölgelerde toplum taramaları ile talasemi taşıyıcıları tespit edilmelidir.

Bu çalışmanın amacı, Aydın ili ve çevresinde beta talasemi taşıyıcısı çocuklarda, mutasyon çeşitliliğini belirlemek ve bu mutasyonların tam kan sayımı parametreleri ve hemoglobin elektroforezi üzerine etkilerini değerlendirmektir.

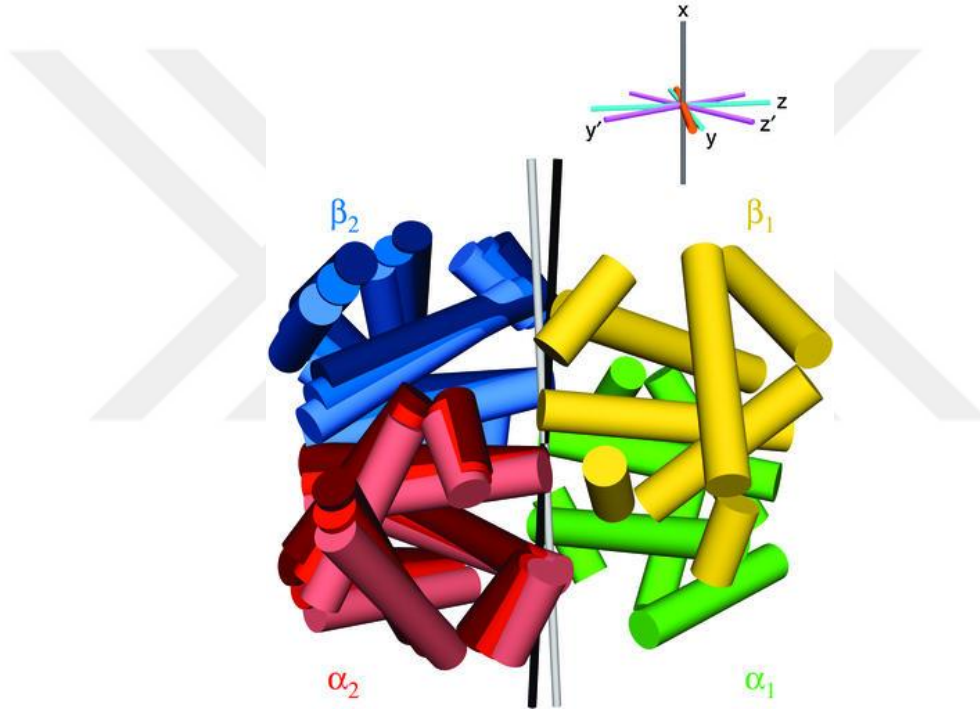


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobin

2.1.1. Hemoglobin Yapı ve İşlevi

Hb, 64.400 dalton ağırlığında dört globin zinciri ile eritrosit içinde bulunan hem molekülüne kovalent bağlarla bağlanmış tetramerik yapıda bir metalloproteindir (Şekil 1). Ana görevi hücre ve dokulara oksijen taşımaktır. Her bir eritrosit hücresinde 300 milyon kadar Hb molekülü bulunduğu bildirilmiştir (7,8).



Şekil 1. Hemoglobinin genel yapısı

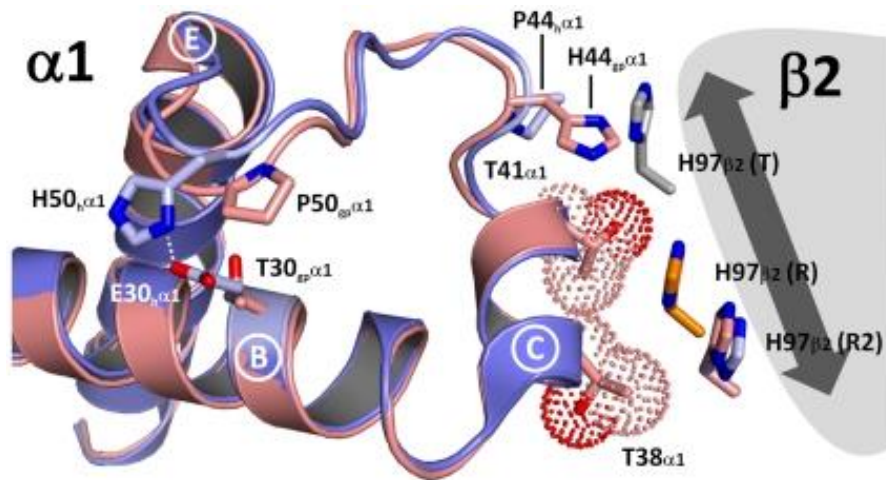
Globin zincirlerindeki polipeptitlerin tetramerindeki bu dört ferröz demir atomuna gazların geri dönüşümlü olarak bağlanması Hb'nin oksijen, karbonmonoksit ve nitrik oksit taşımaya izin verir. Karbondioksit ise diğer gazlardan farklı olarak kanda Hb'nin amino terminal rezidüleri ile zayıf karbomino kompleksi olarak etkileşime girerek çözülmüş olarak taşınır (7).

Hem, protoporfirin IX ve iki değerlikli demir (Fe²⁺) atomundan oluşan bir kompleksdir. Merkezinde Fe²⁺ atomu olan metilen köprüleri ile birbirine bağlanan dört

pirol halkasından meydana gelir (Şekil 2). Hem içindeki Fe^{+2} atomları O_2 'i bağlayarak taşınmasını sağlar (8-10).

Değişik Hb'ler için globin zincirleri farklıdır. Bu farklılıklar; α , β , γ , δ , ϵ ve ζ olarak ifade edilir. Sağlıklı normal erişkinlerde; HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) ve HbF (fetal Hb, $\alpha_2\gamma_2$) yapısında görülür. Embriyonik dönemde; Hb portland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) yapısındadır (11,12). Gelişimin farklı evrelerinde, farklı tipte Hb'ler yapılmaktadır (13). γ zincirinin 136. aminoasit pozisyonunda glisin ve alanin bulunmasına göre iki farklı fetal Hb mevcuttur. γ glisin ($G\gamma$) ve γ alanin ($A\gamma$) zincirlerinin gen lokusları da ayrıdır (12).

Hb molekülünün tetramerik ve allosterik yapısı, fizyolojik işlevin gerçekleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hemoglobin molekülünün %96'sını oluşturan globinlerin üç boyutlu yapılarında Van der Waals bağları bulunmakla birlikte, polar özellikteki amino asit grupları dış yüzeyde, non-polar yan gruplar ise iç yüzeyde bulunmaktadır. Hb molekülü O_2 ile allosterik etkileşimini sağlamaktadır. Hb molekülünün üç boyutlu yapısı 1960'lı yılların başlarında X ışını kristalografisi yöntemi ile belirlenmiştir (7,14). Hb, oksihemoglobin ve deoksihemoglobin durumu için birer tane olmak üzere iki farklı dördüncül yapısı bulunmaktadır. Hb molekülü bir yapıdan diğer yapıya, çoğunlukla farklı Hb alt birimleri arasındaki etkileşimlerin katıldığı, bazı amino asit rezidülerinin hareketleri ile geçmektedir. Ayrıca farklı globin zincirleri arasındaki bağlantı uzaklığı, benzer globin zincirleri arasındakinden daha büyük olduğu için, farklı globin zincirleri arasındaki bağlar daha güçlüdür (15,16).



Şekil 2. Hemoglobin molekülü

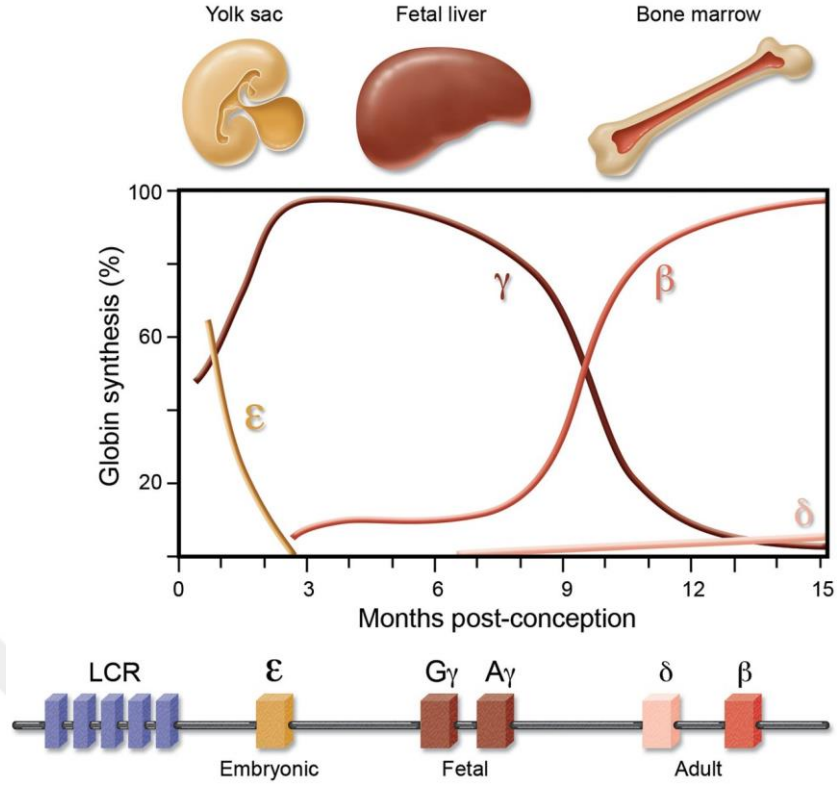
Tablo I. Hemoglobın tipleri

İsim	Dönem	Formül	Erişkin Değeri	Fetüste Yapım Zamanı
Hb Gower I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\varepsilon_2$	–	İlk 3 ayda
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2\varepsilon_2$	–	İlk 3 ayda
Hb Portland I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\gamma_2$	–	İlk 3 aydan sonra ve kordon kanında
Hb Portland II	Embriyonik Hb	$\zeta_2\beta_2$	Hb H ve talasemi taşıyıcılarında az miktarda	İlk 3 aydan sonra
Hb F	Fetal Hb	$\alpha_2\gamma_2$	% 1'den az	İntrauterin 10–12. hafta
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2\beta_2$	% 96	3. trimesterde
Hb A2	Erişkin Hb	$\alpha_2\delta_2$	% 2.5–3.5	6. ve 8. haftada yapımı başlar

Bunların dışında sıra dışı protein yapısına sahip farklı Hb'ler de mevcuttur. Bunlar HbS, HbC ve HbE olarak isimlendirilir ve farklı patolojide anemi tipleri oluştururlar (Orak hücreli anemi vb.). HbA2 ise kemik iliğinde bulunan öncü bir Hb türüdür (17-20).

2.1.2. Hemoglobın Sentezi

Hb farklı iki gelişimsel basamakta sentezlenmesini tamamlamaktadır. Birinci basamak, gestasyonun ilk evrelerinde meydana gelen ve α/β gen kümelerinin ekspresyonel değişimini gerektiren embriyonik globinin fetal globine dönüşümüdür. İkinci basamak, doğum esnasında sadece β gen kümesinde meydana gelen fetal globinden yetişkin tipi globine dönüşüm şeklindedir (21). Memelilerde çok erken gelişim basamakları sırasındaki eritroid farklılaşma çok fazla anlaşılammıştır. Primitif eritroblastlarda embriyonik α ve β benzeri globin genlerinin aktivasyonunu gerektiren embriyonik yumurta kesesinin, kan adacıklarında başladığına inanılmaktadır. İnsanlarda bu Hb dönüşümü gestasyonun beş ya da altıncı haftaları sırasında meydana gelir. Embriyonik globin genleri insan gelişiminin çok erken safhasında aktive edilir. Sadece birkaç haftalığına tekrar kapanmadan önce eksprese edilir. Fetal eritropoez perinatal periyoda kadar görülür, eritropoez tekrar değişime başladığında kemik iliği ve globin gen ekspresyonunun yetişkin tip Hb'nin çatısı kurulur (8, 22).



Şekil 3. İnsan globin genleri arasındaki zamanla olan değişiklik (26)

2.2. Talasemiler

2.2.1. Tanım

Talasemi, Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından, splenomegali ve karakteristik kemik değişiklikleri olan çocuklarda meydana gelen ciddi bir anemi formu olarak ilk kez 1925'te tanımlandı. Tanımlanan vakaların tümünün Akdeniz bölgesindeki çocuklarda tespit edilmesi nedeni ile hastalık Yunanca'da deniz anlamına gelen "*thalassa*" sözcüğünden gelmektedir. Daha sonra bu bozuklukların Akdeniz çevresi ülkeleri ile sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri içine alan geniş bir bölgede görülebildiği ortaya çıkmıştır (13,23).

Talasemiler, globin zinciri yapımının azalmasına ya da yapılamamasına bağlı olarak ortaya çıkan, heterojen bir grup hastalıktır (10,18).

2.2.2. Dünyada Beta Talasemi Epidemiyolojisi

Beta talasemi özellikle Yunanistan'da ve İtalya'da çok sık görülen bir hastalıktır. Po nehrinin deltasında yaşayan insanlarda taşıyıcılığın görülme sıklığı %20 civarındadır. Bölgede batıya doğru ilerlediği zaman hastalık insidansı düşmeye başlar. Kıbrıs'ta %15, İspanya'da %3.5'dir. Bazı ülkelerin değişen coğrafi özellikleriyle hastalığın insidansı değişmektedir. Bulgaristan'ın güneyinde %30 civarında olan sıklık kuzeye gidildikçe %0.5-2.1 değerlerine inmektedir. Dünyanın daha doğusunda Orta Asya Cumhuriyetleri diye nitelendirilen bölgede ise; Azerbaycan'da %6.3-7.8, Dağıstan'da %3.2-16.8, Özbekistan'da %0.2-15.0 arasında değişmektedir (24,25).

2.2.3. Türkiye'de Beta Talasemi Epidemiyolojisi

Türkiye açısından da önemli bir sağlık sorunu olan talasemi taşıyıcılığının insidansı, Çavdar ve Arcasoy'un (26) çalışmasında %2.1 olarak saptanmış, bazı bölgelerde ise insidansın %11.7'ye kadar çıktığı belirtilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ülkemizde talasemi taşıyıcı frekansının %2-11 arasında değiştiği bildirilmektedir (27-29). Ülkemizde Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sık görülmektedir. Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 BTT ve 4000 civarında β -talasemi hastası vardır. Talasemi taşıyıcılığı oranı bölgelere göre farklılık göstermektedir. Adana'da %3,2 Antakya'da %3.7, Antalya'da %10.2 kadarken bizim de içinde bulunduğumuz Ege Bölgesi için Denizli'de %3.6 Muğla'da %4.5 İzmir'de %4.8 ve Aydın'da %5.1'dir (27,30,31).

2.2.4. Beta Talasemide Genetik

Günümüzde β -talasemiye neden olan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Moleküler çalışmalar ile 300'den fazla mutasyon belirlenmiştir. Bunların çoğunu nokta mutasyonları daha az bir kısmını delesyonel mutasyonlar oluşturmaktadır. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlenmesini ve stabilitesini önleyerek normal globin sentezini önler. Buna karşın çerçeve kayması ve zincir mutasyonları translasyonu bloke ederler (24,32).

Beta talasemi hastalarının klinik ve moleküler düzeyde yüksek oranda çeşitlilik gösterdikleri bilinmektedir. Mutasyonlar ve β -globin gen ailesi içerisinde yer alan gen bölgeleri ile etkileşen protein faktörleri birçok çalışmanın temel amacı olmuştur. Nokta

mutasyonları formundaki β -talasemiler; RNA transkripsiyonun başlaması, RNA işlenmesi (*RNA processing*) ve RNA kararlılığını bozarak normal RNA globin zincir sentezini önler iken, çerçeve kayması (*frameshift*) ve erken zincir sonlanması (*nonsense*) gibi beta talasemi mutasyon formları ise, translasyonu bloke etmektedir (33).

Günümüzde dünyada β -talasemiye neden olan 300 civarında farklı mutasyon saptanmıştır (34). Bu mutasyonların yaklaşık 50 tanesi, Akdeniz ülkelerinde farklı sıklıklarda saptanmıştır (35). Talasemi mutasyonları akdeniz ülkelerinde, doğu ve batı bölgelerde farklı sıklıklara sahiptir. Batıya doğru gidildikçe talasemi sıklığı düşmektedir. Kesin mutasyon dağılımlarının belirlenmesi, genetik danışma, evlilik öncesi tarama ve prenatal tanılar için gerekli stratejilerin yorumlanmasında önem kazanmıştır (36). Farklı toplumlarda, β -talasemiye neden olan β -globin genleri arasındaki gensel ilişkilerin ortaya konulabilmesi, birçok çalışmanın ana konusu olmuştur.

Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmaların sonuçları farklılıklar ortaya koymuş ve bu nedenle araştırmacılar farklı toplumlardaki haplotip sıklıklarının değişen dağılım göstermesinin nedeninin göç olduğunu ileri sürmüşlerdir (37). Bu teoriye göre her bir mutasyon tek bir odakta gelişmekte ve bu mutasyon göçler yolu ile yayılmaktadır. Bir kısım araştırmacı ise bazı β -talasemi mutasyonlarının (IVS I-110 (G>A), Codon 39 (C>T), IVS I-6 (T>C) ve -30 (T>A) v.b) ilişkili olduğu farklı haplotip yapıların varlığını rekombinasyon olayları ile açıklamaya çalışmışlardır (17).

Beta talasemi, β -globin genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşur. Bu mutasyonların çoğu nokta mutasyonlar olup, ikinci sıklıkta delesyonlar yer alır. α -talasemilere daha sıklıkla delesyonlar neden olmaktadır. Mutasyonların gen ekspresyon basamaklarındaki çeşitli etkilerine göre sınıflandırma yapılabilir. Bu mutasyonlar gen ekspresyonlarının çeşitli kademelerini etkileyerek β globin sentezini farklı basamaklarda bozmaktadırlar (39).

Beta talasemi'ye neden olan çoğu mutasyonun β globin geninin fonksiyonel olarak önemli bölgelerindeki nokta mutasyonlarla ilgili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar β -talasemili hastalarda β globin geninde 200'den fazla farklı nokta mutasyonu olduğunu göstermektedir (40).

Nokta mutasyonları üç farklı kategoride β globin gen ekspresyonunu gösterirler.

Bu kategoriler:

- Hatalı β -globin gen transkripsiyonuna yol açan promotor ve 5' UTR mutasyonları
- mRNA işlenmesini etkileyen bağlantı bölgesi ve konsensus dizi mutasyonları ile poliadenilasyon ve diğer 3' UTR mutasyonları
- Anormal mRNA translasyonuna neden olan anlamsız mutasyonlar, çerçeve kayması (frameshift) ve başlangıç kodonu mutasyonları

Beta talasemiye neden olan nokta mutasyonları ile birlikte daha nadir görülen büyük gen delesyonları da bildirilmiştir. Talasemilerin en ağır formu olan β^0 talasemilerin delesyon, başlangıç kodonu mutasyonları, anlamsız, çerçeve kayması ve özellikle de birleştirme bölgesi bağlantısındaki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Daha hafif bir talasemi formu olan β^+ talasemilerin ise promotor bölgesi (ya CACCC ya da TATA kutusu), poliadenilasyon sinyali ve 5'-3' UTR bölgelerindeki mutasyonlardan veya splicing anormalliklerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (41).

Konsensüs dizileri içindeki mutasyonlar normal birleşmenin etkinliğini değişen derecelere düşürürler ve hafif ile ağır arasında değişen bir β -talasemi fenotipi üretirler. Örneğin, 5. pozisyondaki IVS I G→C, T veya A mutasyonları, normal eşdeğerleri ile karşılaştırıldığında mutasyona uğramış donör bölgesinde birleşmeyi önemli ölçüde azaltır. Mutasyonların, mutasyona uğramış donör yerine tercihli olarak kullanılan ikisi ekzon 1 ve biri intron 1'de olan üç "kriptik" donör alanının kullanımını da aktive ettiği görülmektedir (42). Öte yandan, komşu nükleotide, intron 1 pozisyon 6'da C'nin T'ye eklenmesi normal RNA eklemesini hafifçe etkiler.

Her ne kadar IVS I-6 T→C mutasyonu daha ılıman β -talasemi ile ilişkili olsa da, çalışmalar bazı durumlarda, aynı mutasyonların ciddi olabileceğini göstermiştir; bu durum muhtemelen mutasyonların ortaya çıktığı kromozomal arka planla ilişkilidir (43). Diğer beta talasemi genleri intron 2 içerisinde yeni donör sahalara sahiptir. Bunlar 654 C→T, 705 T→G ve 745 C→G pozisyonlarını içerir (88,89). Her durumda, 579. pozisyonda özdeş bir yukarı akış alıcı bölge, yeni oluşturulan donör bölge, normal 3' alıcıya eklenirken, ekzon 2/IVS2'deki normal 5' donör bölgesi, 579 nolu pozisyondaki aktif bölgeye

eklenecek şekilde aktive edilmektedir. β -talasemi alellerinin yaklaşık yarısı, ya bir durdurma kodonu yaratan doğrudan mutasyonlar ya da bir ya da birkaç nükleotidin sokulması ya da silinmesiyle okuma çerçevesindeki bir değişiklik nedeniyle, erken sonlandırma kodonlarının girişinden kaynaklanmaktadır. Bu çerçeveler, bir sonraki kodona erişildiğinde akış aşağısında daha erken sona ermeye yol açar. Buna prematüre terminasyon kodonu denilmektedir (43).

2.2.4.1. Gen delesyonları

Alfa talaseminin aksine β -talasemide gen delesyonları çok sık gözlenmez. Bugüne kadar yaklaşık 17 tane gen delesyonu tanımlanmıştır. Beta geninin 3' ucundaki 619-bp delesyonu Pakistan ve Hindistan'daki Sind ve Gujarati popülasyonunda görülen beta talasemilerin %50'sinden sorumludur (44-47).

2.2.4.2. Transkripsiyonel mutasyonlar

Beta genin promotor bölgesinde birçok baz değişimi tanımlanmıştır. CAP bölgesinde CCAAT ve ATA kutusunda görülen mutasyonlar RNA polimerazın, β genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneğini azaltır. β mRNA transkripsiyonu bu durumdan etkilenir ve beta mRNA miktarı azalır. Bütün olguların fenotipi β^+ talasemidir (48,49).

2.2.4.3. RNA processing mutasyonları

Messenger RNA'nın nükleusa girmesini engeller. Tek baz mutasyonudur. Ekzon ve intronun bağlanma noktasında 5' GT (donör) 3' AG (reseptör) bölgesinde olur. β -talaseminin farklı tiplerine IVS I konsensus sekansındaki tek baz değişimi neden olur (47,48,50). Dört farklı şekilde oluşabilmektedir:

- 1- Splice kavşağındaki mutasyonlar
- 2- Konsensus dizi değişikliklerine neden olanlar
- 3- İtronlardaki değişiklikler
- 4- Kodlanan bölgedeki mutasyonlar RNA processing mutasyonları

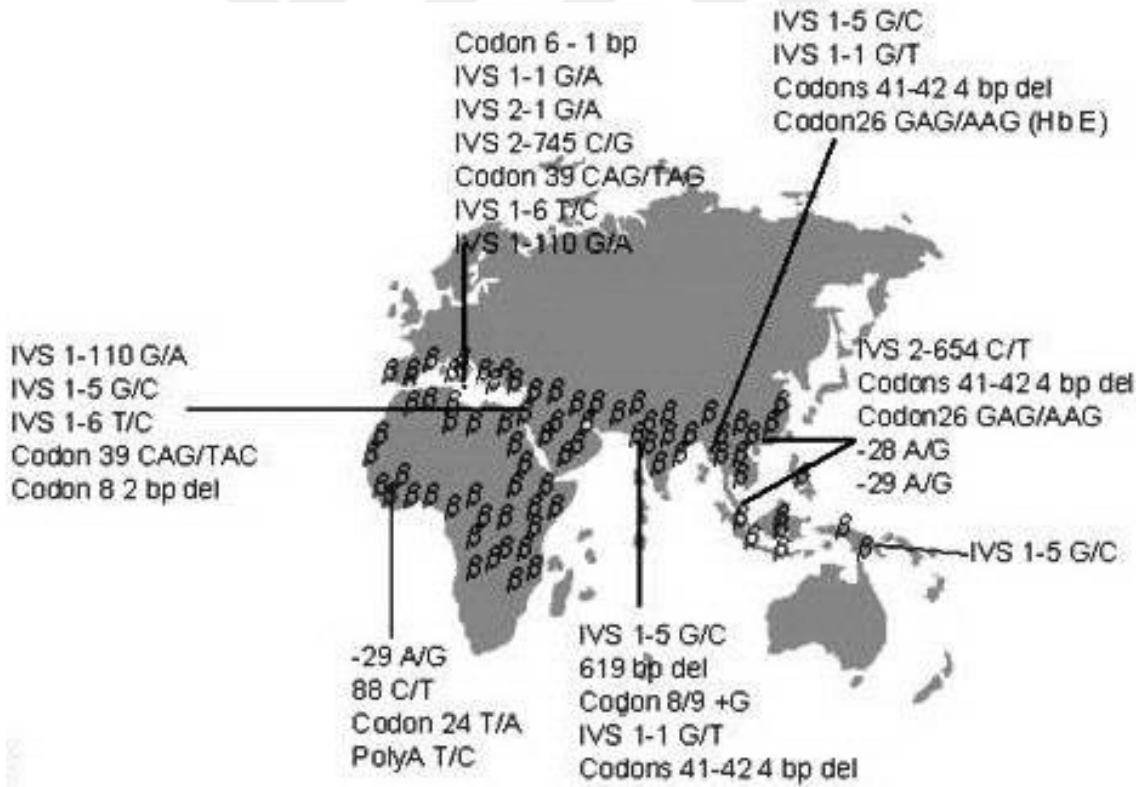
2.2.4.4. RNA translasyon mutasyonları

2.2.4.4.1. Anlamsız mutasyonlar

Tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan kodon, translasyonun durdurulması sinyalini veren durdurucu kodonlardan (UAA, UAG veya UGA) birine döner. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi normal üretim zamanından önce sonlanır (51).

2.2.4.4.2. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları

On sekiz mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek, bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'-3' veya 3'-5' yönünde) oluşan nükleotidlerin yer değişikliği ile farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar (52).

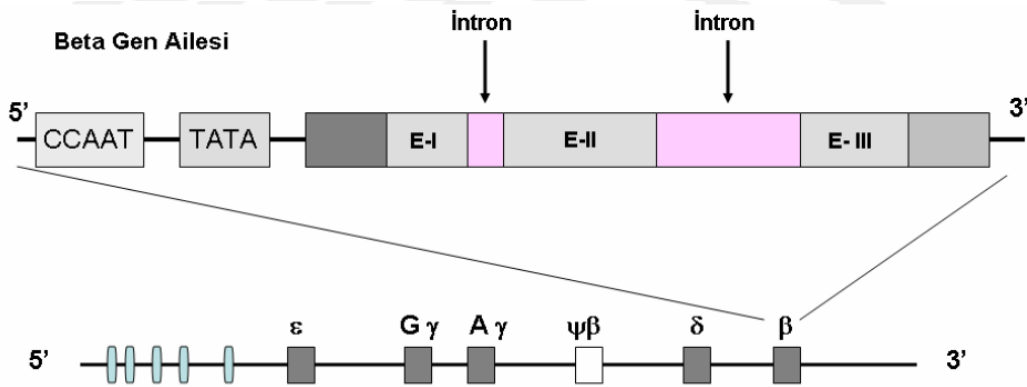


Şekil 4. Beta talasemi mutasyonlarının dünyada dağılımı (53)

2.2.4.5. Beta globin gen ailesi

On birinci kromozomda yer alan (11p 15.5), bütün insan lokusları arasında en yoğun olarak çalışılan gen grubudur. İnsan globin gen ailesi yaklaşık 70 kb uzunluğundadır. β -globin gen ailesi, embriyonik yaşamda eksprese edilen ϵ globin geni, fetal yaşamda eksprese edilen γ ve δ globin genleri, erişkin yaşamda eksprese edilen α ve β globin genleri olmak üzere beş aktif gen ve bir etkin olmayan genden oluşmaktadır. β -globin, β -globin gen ailesinin bir ürünü olup, erişkin Hb yapısında (HbA, $\alpha_2\beta_2$) bulunur. Diğer β -globin gen ailesi ürünleri olan ϵ ve γ - globinler embriyonik ve fetal Hb türlerinin bir üyesi olarak gelişim boyunca eksprese edilmektedir (54,55).

Beta globin gen ailesi yapısı içerisinde yer alan her bir β benzeri gen üç ekzon ve iki intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 4). Beta geni kontrol bölgesi (LCR), β -globin gen ailesi içerisinde yer alan β benzeri globin genlerinin gelişimini ve yetişkin yaşam boyunca dokuya özgü ekspresyonunu kontrol eden, yaklaşık 20 kb uzunluğunda olup, genin 6-18 kb önünde yer almaktadır (56).



Şekil 5. İnsan beta globin gen ailesi yapısı

2.2.5. Beta Talasemi Patofizyolojisi

Onbirinci kromozomda bulunan β -globin genindeki çeşitli mutasyonlar nedeni ile β zinciri yapımı azalmıştır. Bu durum da HbA'nın net sentezinin azalmasına neden olur. Demir eksikliğinde mikrositozun nedeni yeterli hem proteininin bulunmaması iken, talasemide aynı şey globin proteininin eksikliğinden kaynaklanır. Vücutta yeterince β zinciri üretilemediğinden δ zinciri yapılır ve sonuç olarak HbA2 sentezi artmış olur.

2.2.6. Beta Talasemide Klinik

Beta talasemide dört farklı klinik görülmektedir. Bunlar;

- Sessiz taşıyıcı: Hematolojik olarak normal
- Talasemi minör (taşıyıcı, heterozigot): Hafif hipokrom mikrositer anemi
- Talasemi intermedia (hasta, homozigot): Transfüzyon ihtiyacı fazla olmayan
- Talasemi major (hasta, homozigot): Transfüzyona bağımlı

Sessiz Taşıyıcı: Globin sentezinde orta derecede azalma (en sık - 101 promotör mutasyon) vardır. HbA2 düzeyleri ve periferik yaymaları normal, MCV hafif düşük olabilir. Her iki ebeveynin sessiz taşıyıcı olduğu homozigot çocukta orta derecede bir anemi (Hb: 6-7 gr/dl, nadiren transfüzyon gereksinimi) ve hepatosplenomegali görülür (38).

Beta Talasemi Taşıyıcılığı (BTT) üç farklı tipte olabilir;

1. Yüksek A2 ile olan β talasemi taşıyıcılığı

- * En fazla görülen tiptir,
- * HbA2: %3.5-8, HbF: %1-5'dir,
- * β^+ veya β^0 mutasyonlarla olan heterozigotlar farklıdır.
- * Klinik fenotipi β -globin geni mutasyonunun β -globin zincir üretimi üzerindeki etkisi belirler.
- * β^+ taşıyıcılarda MCV ve MCH daha yüksektir. Homozigot çocuklarında transfüzyona bağımlı anemi görülürken, bazen de talasemi intermedia fenotipi olabilir.

2. Yüksek A2, yüksek F ile olan BTT

- * Farklı bir varyanttır.
- * Hem A2 hem de HbF (%5-20) yüksektir.
- * β gen delesyonu varken, δ ve γ genleri sağlamdır.

3. Normal A2 ile olan β talasemi taşıyıcılığı

- * Sessiz taşıyıcılardan ayrılmalıdır. Sessiz taşıyıcılardan farkı, hipokrom mikrositer anemi oluşudur (HbA2 seviyesi sınırdadır).
- * Hem β hem δ geni defektlidir (aynı kromozom veya karşı sağlam kromozomda).
- * Ebeveynlerden biri bu tip, diğeri klasik taşıyıcı ise homozigot çocukta ağır klinik tablo görülür (57,58).

2.2.7. Beta Talasemi Ayırıcı Tanısı

BTT tanısı konulurken aşağıdaki hastalıklardan ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir.

- ❖ Demir eksikliği anemisi
- ❖ Alfa talasemi taşıyıcılığı
- ❖ Kronik hastalık anemisi

BTT'nde eritrosit ve mikrositizmin olması, RDW'nin normal saptanması ayırıcı tanıda önemlidir. BTT'de herhangi bir tedavi vermeye gerek yoktur. Ancak aileye genetik danışmanlık mutlaka verilmeli, hastanın anne, baba ve kardeşleri taşıyıcılık yönünden taranmalıdır (57,58).

Anemiler genellikle sağlıklı olduğu düşünülen çocuklarda rastlantısal olarak veya akut veya kronik hastalığı olan çocuklarda rutin incelemelerde saptanır (59). Hb ve HCT değerlerine göre anemi saptanan çocuklarda eritrosit ile ilgili diğer parametreler aneminin tipini belirlemek açısından değerlidir. Bu parametreler içinde en yararlısı MCV'dir. MCH ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)'nin ise daha az tanısız değeri bulunmaktadır. Bu parametreler kullanılarak bazı indeksler geliştirilmiştir. En sık kullanılanı ise; MCV/RBC olarak tanımlanan Mentzer indeksidir (Mİ) (59,60).

MCV değerlerine göre anemiler mikrositer, normositer ve makrositer olarak sınıflandırılır (61). Mikrositik anemi en sık rastlanan anemidir. Demir eksikliği anemisi en sık görülen mikrositik anemi çeşididir ve tüm anemiler içerisinde de birinci sıradadır. Kronik hastalık anemisi ve talasemi de mikrositik aneminin sık görülen nedenleridir. Bu

nedenle bu iki durumun demir eksikliğinden ayırt edilmeleri, gereksiz demir yüklenmesinin önüne geçilmesi açısından önemlidir (59,61).

Demir eksikliği anemisinde ölçülebilen ilk laboratuvar bulgusu ferritin seviyesinin düşmesidir (61). Ferritin aynı zamanda bir akut faz reaktanıdır. Kronik inflamatuvar hastalıklarda, malignensilerde artabilmesine karşın bu hastalarda bile serum ferritin seviyesi, demir eksikliği tanısı koymadaki önemini korur. Bundan sonraki aşamada serum demir seviyesi düşer, total demir bağlama kapasitesi yükselir ve son evrede anemi ve MCHC'de azalma gözlenir.

Kronik hastalık anemisi genellikle normokrom normositerdir. Fakat, zaman zaman da hipokrom mikrositik olabilmektedir (62). Bu nedenle demir eksikliği ile ayırıcı tanısının yapılması gerekir. Serum ferritin seviyesinin normal veya yükselmiş olmasına karşın serum demir seviyesi ve total demir bağlama kapasitesi düşmüşse kronik hastalık anemisi olasıdır. Nadir de olsa demir eksikliği anemisi kronik hastalık anemisiyle birlikte görülebilmektedir (62).

Talasemiler farklı ağırlık derecelerine sahip, kalıtsal, mikrositik anemilerdir. Otozomal resesif geçen bu bozukluk yetersiz miktarda haberci DNA yapımına yol açar, bu durum Hb polipeptid zincirlerinin yetersiz yapımıyla sonuçlanır. Değişik klinik ve biyokimyasal özellik gösteren çeşitli talasemi tiplerinde Hb'nin değişik polipeptid zincirlerinde (α , β , γ veya δ) yapım kusuru bulunur. Talasemi minör β -talaseminin heterozigot ve hafif anemi ile seyreden taşıyıcılık şeklidir (63). Klinik olarak asemptomatik olan talasemi minör hastaları demir eksikliği anemisi ile en çok karışan mikrositer anemi şeklidir ve genellikle gereksiz olarak demir tedavisi alırlar ve tekrarlayan tetkiklere maruz kalmaktadırlar (64). Talasemi ile demir eksikliği anemisinin ayırıcı tanısında yapılacak ilk işlem kan sayımında RBC'nin belirlenmesidir. RBC talasemi taşıyıcılarında genellikle artmıştır. Demir eksikliğinde ise anemi durumuna göre azalmıştır. Mİ talasemide 13'ün altında iken, demir eksikliğinde bu değer 13 ve üstündedir (64,65). RDW talasemi taşıyıcılarında normaldir, demir eksikliğinde ise artmış olarak bulunur. Ancak, talasemi taşıyıcılarında demir eksikliğinin de olabileceği unutulmamalıdır. BTT tanısı için Hb elektroforeziyle doğrulama gerekmektedir. Hb elektroforezinde HbA2 düzeyinde artış saptanır (66). Demir eksikliği globin zincir sentezini inhibe ederek HbA2 artışını

gizleyebilir (67,68). Bu nedenle BTT olabileceği düşünölen hastalarda demir eksikliği tedavi edildikten sonra Hb elektroforezi bakılması önerilmektedir (63,69).

Beta talasemi taşıyıcılarında HbA2 düzeyi genelde (%95) artmıştır ve bu bulgu BTT tanısı koymakta çok önemli bir parametredir. Bununla birlikte BTT'nin %5 kadarında HbA2 normal veya normalden düşük olabilir. HbA2 düzeyi normal olan BTT tip-1 ve tip-2 olmak üzere iki gruba ayrılır. Tip-1'e sessiz talasemi adı verilir, bu grupta hem HbA2 düzeyi hem de eritrosit indeksleri normal sınırlardadır. Bu durum β -geninin bazı bölgelerindeki mutasyonlarda görülür, bu tabloda en fazla sorumlu olan β -geninin promotor bölgesindeki -101 mutasyonudur. Tip-2 Hb A2 normal talasemide ise HbA2 nin normal olmasına karşılık eritrosit indeksleri basit talasemi taşıyıcılarındaki gibidir. Bu durum β -talasemi mutasyonuna ek olarak δ -talasemi mutasyonu olduğu zaman ortaya çıkar. δ -talasemi mutasyonu β -talasemi mutasyonu ile aynı kromozomda veya karşı kromozomda olabilir. Hb Knossos'da δ -gen mutasyonu ile β -gen mutasyonu aynı kromozom üzerindedir ve bu durum ölkemizde HbA2 normal tip BTT 2'den en çok sorumlu olan patolojidir. Hacettepe Çocuk Hematoloji ünitesinde 5 tane β -talasemi minörlü hastanın anne-babasinda HbA2 düzeyinin normal olduğu ve bu durumun β ve δ talaseminin birlikte olmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (70). Demir eksikliğinde HbA2 düzeyi normaldir, bazı araştırmacılar normalden düşük olduğunu bildirmişlerdir. α talasemi taşıyıcılarında tek gen delesyonunda (α^+ -talasemi) hematolojik bulgu olmadığı halde iki gen delesyonunda (α^0 -talasemi) BTT'de bulunan bütün parametreler vardır, yalnızca HbA2 düzeyi normalden düşüktür. HbA2 normal BTT ve α^0 -talasemi taşıyıcılığının da hafif demir eksikliği anemisinden ayırt edilmesi özellikle kırmızı küre sayısı yüksek olan demir eksikliği anemisi olan olgularda güç olabilir (70).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ile Çocuk Hematoloji polikliniğinde, 1 Ocak 2014-01 Ağustos 2019 tarihleri arasında, demir eksikliği olmayan BTT düşünülmüş ve tanıları mutasyon analizi ile konfirme edilmiş olan 65 hasta çalışmaya alındı. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulundan etik kurul onayı alındı (Ek-1). Bu olguların tanı anındaki tam kan sayımı parametreleri ve HbA2 düzeyi dosya taramaları ve bilgisayar veri sisteminden öğrenildi. Hastaların hemogramları Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda Mindray marka BC-6800 model kan sayımı cihazıyla çalışıldı.

- Hemoglobin (Hb)
- Hematokrit (Hct)
- Eritrosit (RBC)
- Ortalama eritrosit hacmi (MCV)
- Ortalama eritrosit hemoglobini (MCH)
- Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)
- Eritrosit dağılım genişliği (RDW)
- Trombosit sayısı (Plt)

Tam kan sayımı analizi ile saptanan parametreler Mentzer indeksi (MCV/RBC) ve RDW indeksi ($MCV \times RDW / RBC$) formülleri ile hesaplandı. Mentzer indeksi <13 , RDW indeksi <220 talasemi taşıyıcılığı lehine yorumlandı.

Tam Kan Sayımı

Tam kan sayımı cihazında iletken sıvı ortamda iki elektrot ve aralarında daralıp genişleyen bir lobül sistemi vardır. Kanın şekilli elemanlarının genişliğine göre, tübül sistemi genişleyip daralarak farklı potansiyel enerji farkları ile değişik grafikler çıkmaktadır. Bu grafiklerdeki ölçümler hücrelerin hacimleri ve sayısı ile doğru orantılıdır.

Çalışmamızda Hb, Hct ve MCV sınırları Tablo II'ye göre belirlendi (71).

Tablo II. Hb, Hct ve MCV değerlerinin yaş gruplarına göre ortalama ve alt sınır değerleri (71).

Yaş (yıl)	Hb (gr/dL)		Hct (%)		MCV (fl)	
	Ortalama	Alt Sınır	Ortalama	Alt Sınır	Ortalama	Alt Sınır
0.5-1.9	12.5	11.0	37	33	77	70
2-4	12.5	11.0	38	34	79	73
5-7	13.0	11.5	39	35	81	75
8-11	13.5	12.0	40	36	83	76
12-14						
Kız	13.5	12.0	41	36	85	78
Erkek	14.0	12.5	43	37	84	77
15-17						
Kız	14.0	12.0	41	36	87	79
Erkek	15.0	13.0	46	38	86	78
18-49						
Kız	14.0	12.0	42	37	90	80
Erkek	16.0	14.0	47	40	90	80

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hemoglobin moleküllerinin miktarının belirlenmesi için ve ayrıştırılması için HPLC kullanılan hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Zayıf iyon değiştirici (anyon veya katyon değiştiriciler) kolonlar Hb'lerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Globin zincirlerinin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde reverse faz kolonu kullanılarak analiz edilmektedir. Moleküllerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılan bu yöntemde geniş çaplı dolgu maddesi içeren Vaydac C4 kolonu kullanılmaktadır.

Hastaların Hb elektroforezleri ise Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda Aqilent marka 1100 model cihazda HPLC yöntemi ile çalışıldı.

Talasemi ve anormal hemoglobinlerin saptanmasında HPLC doğru ve hassas bir metottur. Hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir olması nedeniyle talasemi taramalarında özellikle kullanılır. Örnekler cihaza verildikten sonra değerlendirmeyi yapan cihaz ayrılma süreleri ve konsantrasyonları okuyarak grafik haline çevirmektedir. Tarama yüzde oranları verilerek sonuçlanmaktadır. Taramalarda vaka kaçırılmaması için HbA2 değerinin %3.5 ve üzerinde alınması Ulusal Hemoglobinopati Konseyi tarafından tavsiye edilmiştir. Selüloz asetat elektroforezinde %4 kabul edilmiştir.

HbF değerleri için ise < %1 normal, %1-5 hafif yüksek, > %5 yüksek olarak kabul edildi (38).

DNA Dizi Analizi

Periferal kandan DNA izolasyonu

Olgulardan alınmış olan 5 cc periferal kan örneğinden genomik DNA izolasyonu ticari kit kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmektedir ve izole edilen genomik DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek saflık ve miktar açısından kontrol edilmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hedef DNA fragmentininin in vitro şartlarda çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

- Çift iplikli DNA'nın denatürasyonu
- Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması
- Yeni DNA zincirlerinin sentezi

PCR'nin ilk aşamasında çift iplikli DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilmektedir. Denatürasyon aşamasından sonra reaksiyon ortamı kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülerek, oligonükleotit primerler komplementer bölgelere bağlanmaktadır. Son aşamada Taq DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 5'→3'yönünde uzatmaya başlanıp, her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkarılmaktadır.

Bu çalışmada, laboratuvar bulgularında demir eksikliği olmayan ve BTT şüphesi bulunan 65 çocuk hastaya ait BTT mutasyon analizinin DNA örneklerinden HBA1 ve HBA2 genlerinin PCR yöntemi ile ayrı ayrı çoğaltıldığı öğrenildi. Kullanılan primer dizileri ve reaksiyon koşulları aşağıda verilmektedir. HBA1 geninin çoğaltılmasında HBA1F-HBA1R primer çifti, HBA2 geninin çoğaltılmasında HBA2F-HBA2R primer çiftleri kullanılmaktadır.

DNA'ların çoğaltılması işleminde PCR mix ve primer mix kullanılmaktadır. PCR miksi bir hasta için 13 µl ve primer miksi için 1 µl alınır. PCR miksi sabit olarak kullanılır. Üzerlerine 1.5-2 µl hasta DNA'sı eklenir. DNA izolasyonu öncesinde yapılmaktadır. Beş adet tüp cihaza verilir ve bu işlem toplamda iki saat sürer. EkzoSAP için PCR ürünleri cihazdan alınır. Her hasta için beş ayrı tüpe (0.2'lik PCR tüpü) beş µl konur. -20 °C ekzoSAP enzim içerikli madde (kirlilik teşkil eden saflaştırma için kullanılan madde) ekzonükleaz enzimi içinde bulunur ve yıkım enzimi içerir. 37 °C'de işi biten PCR artıkları parçalanır. 80°C sıcaklığa çıkıp ekzoSAP da kendini parçalar. Bu aşama 45 dakika sürer.

Sekans PCR ile devam edilir. Burada forward ve reverse primerleri işlev görür. Sağdan ve soldan okuma yaptırılır.

Big Dye Mix hazırlama

Distile su (10.5 µl), sekans buffer (4 µl), big dye karışımı (0.5 µl) için 1.5 ml'lik tüp kullanılır. Üzerlerine 0.5 µl forward primeri, diğerine 0.5 µl reverse primeri eklenir. Bir hasta için olan karışım beş tüpe dağıtılır. Beş tüp reverse, beş tüp forward olarak toplam 10 tüpe dağıtılır.

EkzoSAP'dan çıkan PCR ürünleri cihazdan alınır. EkzoSAP'dan çıkan PCR ürünününün hem forward'a hem reverse'e eklenir. Bunun sonucu olarak içindeki tükenmiş olur. Her yapılan işlemde içinde hava kalmaması sağlanır. Her seferinde tekrar kontrolü yapılır. Bu işlem iki saat sürdükten sonra PCR cihazından alınır.

Son saflaştırma işlemi

Bu işlem için Zymoresearch kitleri kullanılır. Siyah filtreli tüp ve collection tüpleri bulunur. On adet collection tüp ve 10 adet filtreli tüp içine konur. On adet için normal ependorf tüp hazırlanır. Her birine numara verilir ya da hastaların isimleri yazılır. PCR tüpleri ile aynı isimlendirme yapılır. Binding buffer ve wash buffer'lar bulunmaktadır. Birinci hastanın birinci forwardı alınır. Üzerine 240 µl binding buffer eklenir ve karıştırılır. Karışımı birinci hastanın filtreli tüpünün içine dökülür. Temiz PCR ürünü filtrenin üstünde kalır. Atıklar aşağı süzülür. Tüpler alınıp santrifüj cihazından 13.000 rpm'de bir dakika santrifüj edilir. 300 µl wash buffer dökmeden üzerlerine ayrı ayrı eklenir. Tekrar 13.000 rpm'de bir dakika santrifüj edilir. Tüpler cihazdan alınır. Filtre tüp

çıkarılıp sadece eppendorf tüplerine geçirilir. +4°C formamide hıde maddesi ve distile su (1 tüp için 4µl formamid 16 µl distile su) kullanılır. On tüp için 20 µl karışım dağıtılır.

20 µl'lik reaksiyon karışımı:

- 35-50 ng saflaştırılmış PCR ürünü
- 4 µl dizileme reaksiyon karışımı (Sequencing mix, BigDye)
- 3.2 pmol primer (ileri veya geri)
- Distile su içermektedir.

Bu işlem 0.2 ml'lik PCR tüplerinde yapılır, tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen program uygulanır.

Tekrar santrifüj edilip 13.000 rpm'de bir dakika sonra alınır. Filtreli tüpler atılır. Saf PCR ürünü ependorf'da kalır. Sonra sekans cihazına yüklenir. Cihaz ısısı 60°C'ye çıkarılır. 96'lık plate de 16 kuyucuk okutulabilmektedir. 16 kuyucuk dolunca cihaz çalıştırılabilir. Bu işlem yaklaşık bir saat sürer.

Bu işlem 0.2 ml'lik PCR tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirilir. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen programa alınır.

95°C'de 5 dakika hazırlık/ön denatürasyon

94°C'de 60 saniye..... DNA ipliğinin ikiye ayrılması/ denatürasyon

64°C'de 20 saniye..... primerlerin bağlanması

72°C'de 30saniye..... nükleotidler ipliğe göre eşleşerek bağlanıp, 35 kez bu olayı tekrar etmektedir. (1→2→4→16...)

72°C'de yedi dakikalık son uzama ve sonlanma olmaktadır.

Cihaz +4°C' de sonsuz saate ayarlıdır. Ürünler sabaha kadar bu sıcaklıkta bekleyebilirler. Uzun süre işlem yapılmayacak olanlar -20°C'ye kaldırılırlar.

EkzoSAP

37⁰C 30 dakika ortamda işi biten DNA artıkları parçalanır. Ekzonükleaz enzimi cihaz 85⁰C ye çıktığında kendisi de parçalanır. Bu işlem 5 dakika sürer.

Sekans PCR

Forward ve reverse primerleri ile okuma yapılır. Denatürasyona hazırlık; 96⁰C'de 10 saniye ipliğin ayrılması, 50⁰C'de 5 saniye primerin bağlanmasıdır.

60⁰C'de dört dakika nükleotidlerin bağlanması ve bu olayın 25 kez tekrar etmesi durumudur. Bu ürünler +4⁰C'de bekleyebilmektedir. Isının yükselmesi PCR işlemini tekrar başlatabilmektedir ve oluşan ürünlerin yapısını bozabilmektedir.

Pürifikasyon

Analiz

Çalışmanın kontrol edildiği basamaktır. Sanger dizi analizi tekniğinde HBB geni sekans analizine bakılır. Multigen Fast HBB sekans kiti kullanılır. Nokta mutasyonlar bu şekilde saptanabilmektedir.

PCR uygulamalarında kontaminasyonun takibi için ek olarak negatif kontrol de eklenmektedir. Negatif kontrol için PCR bileşenleri, örnekler ile aynı miktarda olup kalıp DNA kullanılmamaktadır, son hacim ise distile su ile tamamlanmaktadır.

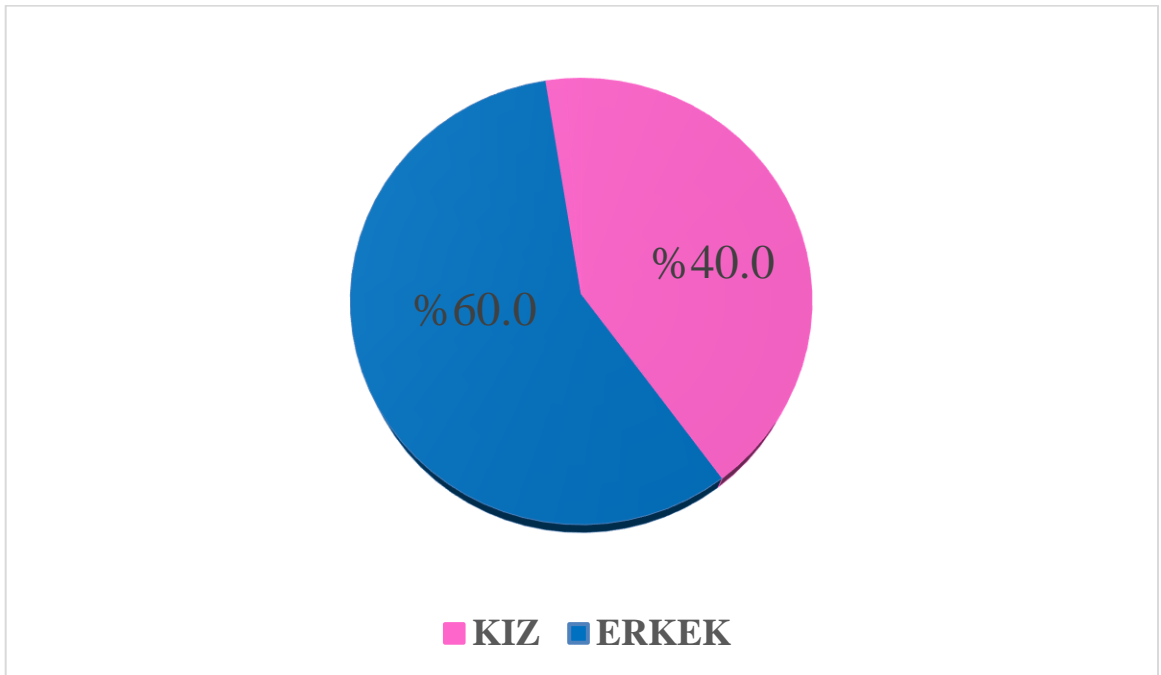
İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma verileri SPSS 21.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmanın tanımlayıcı istatistikleri için normal dağılıma uyan verilerde ortalama ve standart sapma, normal dağılıma uymayan verilerde ortanca, minimum ve maksimum kullanılarak gösterilmiştir. Araştırmada kategorik değişkenler arasında fark olup olmadığını göstermek için Ki Kare testi kullanılmıştır. Bağımsız gruplarda sürekli değişkenlerin parametrik özellikleri taşıyanlarının karşılaştırılmasında Anova, bağımsız gruplarda sürekli değişkenlerin parametrik özellikleri taşımayanlarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin 0,05'den küçük saptanması koşulu arandı.

4. BULGULAR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları ve Çocuk Hematolojisi Polikliniği'nde 01.01.2014-01.08.2019 tarihleri arasında demir eksikliği anemisi olmayan ve beta talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan ve mutasyon analizi çalışılmış olan 65 hasta çalışmaya alındı.

Hastaların 39'u (%60.0) erkek, 26'sı (%40.0) kızdı (Şekil 6) ve yaş ortalaması 8.34 ± 4.94 yıl (dağılım 1.0–18.0) idi.



Şekil 6. Cinsiyete göre hastaların dağılımı

Hastaların ortalama Hb düzeyi 10.55 ± 1.07 gr/dl (dağılım, 8.00–13.10), ortalama RBC düzeyi 5580 ± 538 (dağılım, 3300–6670), ortalama MCV düzeyi 59.38 ± 5.48 fl (dağılım, 47.50–74.60), ortalama MCH düzeyi 18.77 ± 1.96 pg (dağılım, 14.10–24.70), ortalama MCHC düzeyi 31.85 ± 0.94 pg (dağılım, 29.6–33.8), ortalama plt düzeyi 387.58 ± 120.04 ($10^9/l$) (dağılım 215.0–787.0), ortalama Hct düzeyi 33.00 ± 3.31 (dağılım, 27.0–43.4), ortalama RDW düzeyi 16.95 ± 2.63 (dağılım, 14.0–32.9), ortalama HbA2 düzeyi 4.75 ± 0.86 (dağılım, 2.42–6.70), ortalama HbF düzeyi 2.80 ± 3.28 (dağılım, 0.00–15.67) idi. Hastaların tam kan sayımı parametreleri ve elektroferes sonuçları Tablo III'de gösterildi.

Tablo III. Tam kan sayımı parametreleri ve elektroforez sonuçları

	n	Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum	SS*
Hb (gr/dl)	65	10.55	10.60	8.00	13.10	1.07
RBC (10 ⁹ /l)	65	5580	5640	3300	6670	538
MCV (fl)	65	59.38	59.00	47.50	74.60	5.48
MCH (pg)	65	18.77	18.55	14.10	24.70	1.96
MCHC (gr/dl)	65	31.85	31.95	29.60	33.80	.94
Platelet (10 ⁹ /l)	65	387.58	364.50	215.00	787.00	120.04
Hct (%)	65	33.00	33.20	27.00	43.40	3.31
RDW (%)	65	16.95	16.25	14.00	32.90	2.63
HbA2 (%)	65	4.75	4.73	2.42	6.70	.86
HbF (%)	65	2.80	1.80	.00	15.67	3.28

*SS: Standart sapma

Hastalarımızda 17 farklı mutasyon saptandı. En sık görülen dört mutasyon sırasıyla IVS I-110 G>A Heterozigot (%44.11), IVS I-1 G>A Heterozigot (%8.82), IVS I-6 T>C Heterozigot (%7.35) ve IVS II-745 (%7.35) idi. Saptanan tüm mutasyonların dağılımı ve sıklığı Tablo IV’de gösterildi.

Tablo IV. Beta talasemi taşıyıcılarında mutasyon dağılımı ve sıklığı

Mutasyon	Sayı	Yüzde (%)
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	44.11
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	8.82
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	7.35
IVS II-745	5	7.35
c.31 C>T Heterozigot	3	4.41
Codon 39 C>T Heterozigot	3	4.41
IVS II-1 G>A Heterozigot	2	2.94
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	2	2.94
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	2	2.94
IVS I-116 T>G Heterozigot	2	2.94
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	2	2.94
c.135 del C (Codon 44(-C))	1	1.47
IVS II 81 C>T Heterozigot	1	1.47
c.-29 G>A Heterozigot	1	1.47
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	1	1.47
c.17-18 del CT Heterozigot	1	1.47
-87 C>T Heterozigot	1	1.47

IVS II-745 mutasyonu beş hastada saptandı. Bu hastaların üçüne c.31 C>T Heterozigot mutasyonu da eşlik ediyordu. Bu nedenle çalışmamızda 65 hasta yer almasına rağmen 68 mutasyon saptamış olduk.

Cinsiyetlere göre mutasyonlar değerlendirildiğinde, erkekler ve kızlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (p=0.599). Hastaların mutasyonlara göre cinsiyet dağılımı Tablo V’de gösterildi.

Tablo V. Mutasyonlara göre cinsiyet dağılımı

Mutasyon	Cinsiyet				p
	Erkek		Kız		
	n	%	n	%	
IVS I-110 G>A Heterozigot	17	41.5	13	48.1	0.599
IVS I-1 G>A Heterozigot	5	12.2	1	3.7	
IVS I-6 T>C Heterozigot	4	9.8	1	3.7	
IVS II-745	3	7.3	2	7.4	
c.31 C>T Heterozigot	2	4.9	1	3.7	
Codon 39 C>T Heterozigot	2	4.9	1	3.7	
IVS II-1 G>A Heterozigot	1	2.4	1	3.7	
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	1	2.4	1	3.7	
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	2	4.9	0	0.0	
IVS I-116 T>G Heterozigot	0	0.0	2	7.4	
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	1	2.4	1	3.7	
c.135 del C (Codon 44(-C))	0	0.0	1	3.7	
IVS II 81 C>T Heterozigot	1	2.4	0	0.0	
c.-29 G>A Heterozigot	1	2.4	0	0.0	
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	1	2.4	0	0.0	
c.17-18 del CT Heterozigot	0	0.0	1	3.7	
-87 C>T Heterozigot	0	0.0	1	3.7	
Toplam	41	100	27	100	

Hastaların ortalama Hb düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 10.55 ± 1.09 gr/dl (dağılım, 8.0-13.0), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 10.17 ± 0.81 gr/dl (dağılım, 9.0-11.3), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 10.96 ± 0.55 gr/dl (dağılım, 10.2-11.5) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 10.34 ± 0.69 gr/dl (dağılım, 9.5-11.1) idi. Ortalama Hb düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.408$). En sık görülen dört mutasyonun Hb değerleri Tablo VI'da gösterildi.

Tablo VI. Mutasyonlara göre hemoglobin düzeyleri

Mutasyon	Hemoglobin (gr/dL)						p
	n	Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum	*SS	
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	10.55	10.60	8.00	13.00	1.09	0.408
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	10.17	10.05	9.00	11.30	.81	
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	10.96	11.10	10.20	11.50	.55	
IVS II-745	5	10.34	10.20	9.50	11.10	.69	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama Hct düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 33.11 ± 3.53 (dağılım, 27.00-43.40), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 31.62 ± 2.50 (dağılım, 27.70-35.20), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu

saptananlarda 33.84 ± 2.64 (dağılım, 31.00–36.50) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 32.24 ± 2.99 (dağılım, 28.00–35.50) idi. Ortalama Hct düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.544$). En sık görülen dört mutasyonun Hct değerleri Tablo VII’de gösterildi.

Tablo VII. Mutasyonlara göre hematokrit düzeyleri

Mutasyon	n	Hct (%)				*SS	p
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	33.11	33.30	27.00	43.40	3.53	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	31.62	31.30	27.70	35.20	2.50	0.544
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	33.84	34.30	31.00	36.50	2.64	
IVS II-745	5	32.24	33.20	28.00	35.50	2.99	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama RBC düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 5680 ± 3840 (dağılım, 4880–6520), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 5780 ± 2960 (dağılım, 5560–6360), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 5400 ± 2450 (dağılım, 5050–5660) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 5460 ± 4880 (dağılım, 4830–6010) idi. Ortalama RBC düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.170$). En sık görülen dört mutasyonun RBC değerleri Tablo VIII’de gösterildi.

Tablo VIII. Mutasyonlara göre kırmızı küre sayısı düzeyleri

Mutasyon	n	RBC ($10^9/L$)				*SS	p
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	5680	5700	4880	6520	384.89	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	5780	5690	5560	6360	296.09	0.170
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	5400	5400	5050	5660	245.46	
IVS II-745	5	5460	5510	4830	6010	488.70	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama MCV düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 58.44 ± 4.59 fl (dağılım, 47.50–72.00), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 54.63 ± 3.57 fl (dağılım, 48.20–58.80), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 63.92 ± 1.38 fl (dağılım, 61.70–65.10) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 62.20 ± 3.99 fl (dağılım, 55.30–64.90) idi. Ortalama MCV düzeyleri arasında

istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.002). En sık görülen dört mutasyonun MCV düzeyi Tablo IX’da gösterildi.

Tablo IX. Mutasyonlara göre MCV düzeyleri

Mutasyon	n	MCV (fl)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	58.44	57.80	47.50	72.00	4.59	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	54.63	55.35	48.20	58.80	3.57	0.002
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	63.92	64.50	61.70	65.10	1.38	
IVS II-745	5	62.20	63.40	55.30	64.90	3.99	

Hastaların ortalama MCH düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 18.62 ± 1.65 pg (dağılım, 14.10–23.30), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 17.60 ± 1.2 pg (dağılım, 15.70–19.20), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 19.00 ± 2.88 pg (dağılım, 14.10–21.70) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 19.2 ± 1.55 pg (dağılım, 16.9–20.3) idi. Ortalama MCH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0.184). En sık görülen dört mutasyonun MCH düzeyleri Tablo X’de gösterildi.

Tablo X. Mutasyonlara göre MCH düzeyleri

Mutasyon	n	MCH (pg)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	18.62	18.50	14.10	23.30	1.65	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	17.60	17.75	15.70	19.20	1.20	0.184
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	19.00	19.60	14.10	21.70	2.88	
IVS II-745	5	19.20	19.80	16.90	20.30	1.55	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama MCHC düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 31.88 ± 0.83 gr/dl (dağılım, 29.60–33.30), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 32.22 ± 0.48 gr/dl (dağılım, 31.40–42.70), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 31.70 ± 1.13 gr/dl (dağılım, 30.80–33.30) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 31.38 ± 0.76 gr/dl (dağılım, 30.60–32.40) idi. Ortalama MCHC değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0.323). En sık görülen dört mutasyonun MCHC değerleri Tablo XI’de gösterildi.

Tablo XI. Mutasyonlara göre MCHC düzeyleri

Mutasyon	n	MCHC (gr/dl)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	31.88	31.80	29.60	33.30	0.83	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	32.22	32.30	31.40	42.70	0.48	0.323
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	31.70	31.20	30.80	33.30	1.13	
IVS II-745	5	31.38	31.25	30.60	32.40	0.76	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama platelet düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 400.83 ± 136.7 (dağılım, 226.0–787.0), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 352.1 ± 107.6 (dağılım, 215.0–545.0), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 395.60 ± 148.7 (dağılım, 252.0–627.0) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 362.0 ± 138.2 (dağılım, 276.0–568.0) idi. Ortalama platelet değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.845$). En sık görülen dört mutasyonun platelet değerleri Tablo XII’de gösterildi.

Tablo XII. Mutasyonlara göre trombosit sayısı düzeyleri

Mutasyon	n	Trombosit Sayısı ($10^9/L$)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	400.83	372.5	226.0	787.0	136.7	
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	532.17	336.5	215.0	545.0	107.6	0.845
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	395.6	370.0	252.0	627.0	148.7	
IVS II-745	5	362.0	302.0	276.0	568.0	138.2	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama RDW düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 16.51 ± 1.29 (dağılım, 14.90–19.60), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 16.88 ± 1.51 (dağılım, 15.40–19.40), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 15.50 ± 1.18 (dağılım, 14.10–17.10) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 16.25 ± 1.16 (dağılım, 15.00–17.80) idi. Ortalama RDW değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.326$). En sık görülen dört mutasyonun RDW değerleri Tablo XIII’de gösterildi.

Tablo XIII. Mutasyonlara göre RDW dağılımı

Mutasyon	n	RDW (%)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	16.51	16.20	14.90	19.60	1.29	0.326
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	16.88	16.25	15.40	19.40	1.51	
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	15.50	15.80	14.10	17.10	1.18	
IVS II-745	5	16.25	16.10	15.00	17.80	1.51	

Hastaların ortalama HbA2 düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 4.77 ± 0.71 (dağılım, 3.70-6.70), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 5.02 ± 0.98 (dağılım, 3.50-5.90), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 4.39 ± 0.71 (dağılım, 3.40-5.24) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 5.00 ± 0.73 (dağılım, 4.40-6.10) idi. Ortalama HbA2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p= 0.424$). En sık görülen dört mutasyonun HbA2 değerleri Tablo XIV’de gösterilmiştir.

Tablo XIV. Mutasyonlara göre HbA2 dağılımı

Mutasyon	n	HbA2 (%)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	4.77	4.74	3.70	6.70	0.71	0.424
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	5.02	5.45	3.50	5.90	0.98	
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	4.39	4.34	3.40	5.24	0.71	
IVS II-745	5	5.00	4.72	4.40	6.10	0.73	

*SS: Standart sapma

Hastaların ortalama HbF düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 2.34 ± 2.94 (dağılım, 0.00-13.32), IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 1.35 ± 1.48 (dağılım, 0.00-3.70), IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 1.83 ± 3.00 (dağılım 0.00-6.90) ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 2.44 ± 1.66 (dağılım, 0.00-4.00) idi. Ortalama HbF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.726$). En sık görülen dört mutasyonun HbF değerleri Tablo XV’de gösterildi.

Tablo XV. Mutasyonlara göre HbF düzeyleri

Mutasyon	n	HbF (%)				*SS	P
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum		
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	2.34	1.62	.00	13.32	2.94	0.726
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	1.35	0.94	.00	3.70	1.48	
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	1.83	.00	.00	6.90	3.00	
IVS II-745	5	2.44	2.21	.00	4.00	1.66	

*SS: Standart sapma

Altmış beş hastada belirlenen toplam 68 mutasyon RDW indekslerine göre incelendiğinde, dört mutasyonda (%5.88) RDW indeksinin >220 olduğu, 64 mutasyonda ise (%94.11) ≤220 olduğu saptandı. RDW indeksi düşük olan mutasyonlar kendi içinde incelendiğinde iki tanesi (%50) c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) mutasyonu, bir tanesi (%25) c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot) mutasyonu ve bir tanesi de (%25) -87 C>T Heterozigot mutasyonu olarak belirlendi. Bu hastaların hiçbirinde demir eksikliği anemisi yoktu. c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) mutasyonu olan iki hastanın da (%100) RDW indeksi >220 olarak bulundu. Tüm mutasyonlar arasında en sık görülen dört mutasyon olan IVS I-110 G>A Heterozigot (n=30), IVS I-1 G>A Heterozigot (n=6), IVS I-6 T>C Heterozigot (n=5) ve IVS II-745 (n=5) mutasyonlarına sahip olan hastaların tamamında RDW indeksi ≤220 olarak bulundu. RDW indekslerine göre mutasyonların dağılımı Tablo XVI'da gösterildi.

Tablo XVI. RDW indeksine göre mutasyonların dağılımı

Mutasyon	RDW İndeksi			
	>220		≤220	
	n	%	n	%
IVS I-110 G>A Heterozigot	0	0.0	30	46.9
IVS I-1 G>A Heterozigot	0	0.0	6	9.4
IVS I-6 T>C Heterozigot	0	0.0	5	7.8
IVS II-745	0	0.0	5	7.8
c.31 C>T Heterozigot	0	0.0	3	4.7
Codon 39 C>T Heterozigot	0	0.0	3	4.7
IVS II-1 G>A Heterozigot	0	0.0	2	3.1
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	2	50.0	0	0.0
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	1	25.0	1	1.6
IVS I-116 T>G Heterozigot	0	0.0	2	3.1
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	0	0.0	2	3.1
c.135 del C (Codon 44(-C))	0	0.0	1	1.6
IVS II 81 C>T Heterozigot	0	0.0	1	1.6
c.-29 G>A Heterozigot	0	0.0	1	1.6
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	0	0.0	1	1.6
c.17-18 del CT Heterozigot	0	0.0	1	1.6
-87 C>T Heterozigot	1	25.0	0	0.0
Toplam	4	100.0	64	100.0

Mutasyonların HbF ile olan ilişkisi incelendiğinde, 21 mutasyonda (%30.88) HbF değeri sıfır, 3 mutasyonda (%4.41) HbF değeri 0–1 arasında, 32 mutasyonda (%47.05) HbF değeri 1–5 arasında ve 12 mutasyonda (%17.64) beşten büyük olarak belirlendi. En sık gördüğümüz mutasyon olan IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonunu (n=30) kendi içinde değerlendirildiğinde, en çok görülen HbF değerleri 1-5 arasında idi (%43.33). En sık görülen diğer üç mutasyondan IVS I-1 G>A Heterozigot (n=6) ve IVS II-745 (n=5) mutasyonlarında saptanan HbF değerleri en çok 1–5 arasında iken (sırasıyla %50, %80) IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonunda (n=5) saptanan HbF değerleri en çok sıfırdı (%60). Mutasyonların HbF ile olan ilişkisi Tablo XVII’de gösterildi.

Tablo XVII. Mutasyonların HbF ile olan ilişkisi

Mutasyon	HbF							
	0		0-1		1-5		>5	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IVS I-110 G>A Heterozigot	11	52.4	1	33.3	13	40.6	5	41.7
IVS I-1 G>A Heterozigot	2	9.5	1	33.3	3	9.4	0	0.0
IVS I-6 T>C Heterozigot	3	14.3	0	0.0	1	3.1	1	8.3
IVS II-745	1	4.8	0	0.0	4	12.5	0	0.0
c.31 C>T Heterozigot	1	4.8	0	0.0	2	6.3	0	0.0
Codon 39 C>T Heterozigot	0	0.0	0	0.0	2	6.3	1	8.3
IVS II-1 G>A Heterozigot	0	0.0	0	0.0	2	6.3	0	0.0
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	0	0.0	0	0.0	1	3.1	1	8.3
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	0	0.0	0	0.0	1	3.1	1	8.3
IVS I-116 T>G Heterozigot	0	0.0	0	0.0	1	3.1	1	8.3
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	0	0.0	1	33.3	0	0.0	1	8.3
c.135 del C (Codon 44(-C))	1	4.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS II 81 C>T Heteroigot	1	4.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.-29 G>A Heterozigot	1	4.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	0	0.0	0	0.0	1	3.1	0	0.0
c.17-18 del CT Heterozigot	0	0.0	0	0.0	1	3.1	0	0.0
-87 C>T Heterozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	8.3
Toplam	21	100	3	100	32	100	12	100

Mutasyonların Mİ ile ilişkisine bakıldığında en sık dört mutasyon olan IVS I-110 G>A Heterozigot (n=30), IVS I-1 G>A Heterozigot (n=6), IVS I-6 T>C Heterozigot (n=5) ve IVS II-745 (n=5)’in ortalama Mentzer indeks değerleri sırası ile 10.34±1.18, 9.46±0.82, 11.8±0.41 ve 11.37±1.73 idi. Ortalama Mİ değeri 13’ün üzerinde saptanan mutasyonlar ise; IVS I-110+-87 C>T Heterozigot (16.94), IVS II 81 C>T Heterozigot (14.49), c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot) (13.52±1.65) ve c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) (14.72±3.22) idi (Tablo XVIII). Mutasyobların Mİ ile olan ilişkisi Tablo XVII’de gösterildi.

Tablo XVIII. Mutasyonların Mentzer indeksi ile ilişkisi

Mutasyon	n	Mentzer İndeksi				*SS
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum	
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	10.34	10.47	8.30	13.09	1.18
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	9.46	9.57	8.38	10.43	.82
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	11.85	11.67	11.40	12.35	.41
IVS II-745	5	11.37	11.42	9.20	13.44	1.73
c.31 C>T Heterozigot	3	10.68	11.34	9.20	11.49	1.28
Codon 39 C>T Heterozigot	3	10.14	10.24	8.92	11.25	1.17
IVS II-1 G>A Heterozigot	2	8.57	8.57	8.20	8.95	.53
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	2	14.72	14.72	12.44	17.00	3.22
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	2	13.52	13.52	12.36	14.69	1.65
IVS I-116 T>G Heterozigot	2	11.38	11.38	11.09	11.66	0.40
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	2	9.45	9.45	8.89	10.00	0.78
c.135 del C (Codon 44(-C))	1	8.71	8.71	8.71	8.71	.
IVS II 81 C>T Heteroigot	1	14.49	14.49	14.49	14.49	.
c.-29 G>A Heterozigot	1	12.19	12.19	12.19	12.19	.
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	1	9.24	9.24	9.24	9.24	.
c.17-18 del CT Heterozigot	1	10.24	10.24	10.24	10.24	.
-87 C>T Heterozigot	1	16.94	16.94	16.94	16.94	.

Tüm mutasyonların altmış bir tanesi (%89.7) Aydın ilinde saptandı. Diğerleri ise; beş mutasyon Muğla ilinde, bir mutasyon İzmir ilinde ve bir mutasyon da Denizli ilinde idi. Saptanan mutasyonların illere göre dağılımı Tablo XIX'da gösterildi.

Tablo XIX. Mutasyonların illere göre dağılımı

Mutasyon	Bölge							
	Aydın		Denizli		Muğla		İzmir	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IVS I-110 G>A Heterozigot	26	42.6	1	100.0	2	40.0	1	100.0
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	9.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	8.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS II-745	4	6.6	0	0.0	1	20.0	0	0.0
c.31 C>T Heterozigot	2	3.3	0	0.0	1	20.0	0	0.0
Codon 39 C>T Heterozigot	3	4.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS II-1 G>A Heterozigot	2	3.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	2	3.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	2	3.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS I-116 T>G Heterozigot	2	3.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	1	1.6	0	0.0	1	20.0	0	0.0
c.135 del C (Codon 44(-C))	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
IVS II 81 C>T Heteroigot	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.-29 G>A Heterozigot	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.17-18 del CT Heterozigot	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
-87 C>T Heterozigot	1	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Toplam	61	100	1	100	5	100	1	100

Mutasyonların gerçekleştiği gen bölgesi analiz edildiğinde 68 mutasyonun 43 tanesinde (%63.3) intron 1 bölgesinde, 10 tanesinde (%15.87) intron 2 bölgesinde, 10 tanesinde (%15.87) ekson 1 bölgesinde ve beş tanesinde (%7.93) ekson 2 bölgesinde mutasyon saptandı. En sık mutasyon olan IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyon (n=30) ile birlikte diğer sık mutasyonlar olan IVS I-1 G>A Heterozigot (n=6) ve IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonda (n=5) intron 1 bölgesinde mutasyon saptandı. Mutasyon bölgeleri içerisinde en az rastlanan gen bölgesi ekson 2 (n=5; %7.93) olarak belirlenmiş olup bu bölgedeki mutasyonların %60'ını Codon 39 C>T Heterozigot mutasyonu oluşturmaktadır. Mutasyonların gerçekleştikleri gen bölgeleri Tablo XX'de gösterildi.

Tablo XX. Mutasyonlar ve gerçekleştikleri gen bölgeleri

Mutasyon	n	%	Mutasyon Bölgesi
IVS I-110 G>A Heterozigot	30	69.7	Intron 1
IVS I-1 G>A Heterozigot	6	13.9	
IVS I-6 T>C Heterozigot	5	11.6	
IVS I-116 T>G Heterozigot	2	4.6	
Toplam	43	100.0	
Mutasyon	n	%	Mutasyon Bölgesi
IVS II-745	5	50.0	Intron 2
IVS II-1 G>A Heterozigot	2	20.0	
c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot)	2	20.0	
IVS II 81 C>T Heterozigot	1	10.0	
Toplam	10	100.0	
Mutasyon	n	%	Mutasyon Bölgesi
c.31 C>T Heterozigot	3	30.0	Ekzon 1
c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot	2	20.0	
c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)	2	20.0	
c.-29 G>A Heterozigot	1	10.0	
c.17-18 del CT Heterozigot	1	10.0	
-87 C>T Heterozigot	1	10.0	
Toplam	10	100.0	
Mutasyon	n	%	Mutasyon Bölgesi
Codon 39 C>T Heterozigot	3	60.0	Ekzon 2
c.112 delT (p.Trp38Glyfs)	1	20.0	
c.135 del C (Codon 44(-C))	1	20.0	
Toplam	5	100.0	

Hastaların %87.7'sinde anemi mevcuttu. Anemisi olan tüm hastaların MCV değeri düşüktü. RBC %87.7 hastada yüksekti. Hastaların Hb, HCT, MCV ve RBC değerlerinin dağılımı Tablo XXI'de gösterilmiştir.

Tablo XXI. Hastaların Hb, MCV ve RBC değerlerinin dağılımı

Hb (gr/dl)		MCV (fl)		RBC (10⁹/L)	
N/↑	↓	N/↑	↓	≤5000	>5000
8(%12.3)	57(%87.7)	0	65(%100)	8 (%12.3)	57 (%87.7)

Hastaların HbA2 değerleri incelendiğinde dört hastada HbA2 değeri %3.5'in altında idi. Bu hastalarda görülen mutasyonlar IVS I-6 G>A Heterozigot, IVS II 81 C>T Heterozigot, c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot) ve -87 C>T Heterozigot mutasyonları idi. HbA2 değerine göre %3.5'in altında ve üstünde olan hastaların dağılımı Tablo XXII'de gösterildi.

Tablo XXII. HbA2 düzeyi normal ya da yüksek olan hastaların dağılımı

HbA2 (%)	
<%3.5	≥%3.5
4 (%6.1)	61 (%93.8)

Hastaların RDW değerleri incelendiğinde RDW düzeyi normal olan hasta saptanmadı. Yirmi iki hastada (%33.8) hafif yüksek (%14-%16), kırk üç hastada ise (%66.2) yüksek (≥%16) saptandı. RDW düzeylerine göre hastaların dağılımı Tablo XXIII'de gösterilmiştir.

Tablo XXIII. RDW düzeylerine göre hastaların dağılımı

RDW (%)		
Normal < 12-14	Hafif yüksek 14-16	Yüksek ≥ 16
0	22 (%33.8)	43 (%66.2)

5. TARTIŞMA

Hemoglobinopatiler pek çok ülkede önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (72-75).

Ülkemiz coğrafi konumu nedeniyle çok fazla sayıda toplumun etkisi altında kalmıştır. Bu nedenle ülkemizde farklı çeşitlilikte mutasyonlar saptanmıştır. Dünyada BTT en sık görülen tek gen hastalığı olup, dünya popülasyonunun yaklaşık %4.5'i globin zincirinde bir mutasyon taşımaktadır (76,77). Talasemi taşıyıcılığı oranı bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte Adana %3.2, Antakya'da %3.7, Antalya'da %10.2 iken bizimde içinde bulunduğumuz Ege Bölgesinde Denizli'de %3.6 Muğla'da %4.5, İzmir'de %4.8 ve Aydın'da %5.1, Türkiye'de ise ortalama %2.1 olarak bildirilmiştir (27,30,31).

Aydın'da talasemi taşıyıcılık oranının yüksek olması nedeni ile ilimizdeki mutasyon çeşitliliğinin değerlendirilmesi ve sık görülen mutasyonların belirlenmesi toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir.

BTT açısından otozomal resesif geçiş nedeniyle cinsiyetler arasında fark beklenmemektedir. Öney ve ark.(1) Antalya bölgesinde hastalarının %42.8'inin erkek, %57.2'sinin kız olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda hastalarımızın %60'ı erkek, %40'ı kızdı.

Hastaların cinsiyetleri ile mutasyonları arasındaki ilişki incelendiğinde, cinsiyetler açısından mutasyonlar arasında anlamlı bir fark saptamadık.

Tam kan sayımı parametrelerinden Hb, BTT olan bireylerde normal ya da düşük olabilmektedir. Normal değerleri yaşa ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir (71). Bu nedenle tam kan sayımı sonuçları değerlendirilirken hastalarımızın yaşı ve cinsiyeti göz önüne alınmıştır. Talasemi taşıyıcılarında Hb düzeyi genellikle 8 gr/dl'nin üzerinde gözlenmektedir. Daha düşük saptanması durumunda anemiye katkıda bulunan ek faktörlerin araştırılması önerilmektedir (78). Hb düzeyleri Arpacı ve ark.'nın (82) çalışmasında 7.8-14.5 gr/dl iken, Tanrıverdi ve ark.'nın (83) çalışmasında 5.7-14.4 gr/dl, Topal'ın tez çalışmasında ise 8.7-14.9 gr/dl tespit edilmiştir (80). Hastalarımızın tam kan sayımı sonuçları değerlendirildiğinde ise Hb düzeylerini 8-13 gr/dl arasında olup %87.7'sinde anemi mevcuttu. Hastalarımızda demir eksikliği anemisi yoktu. Hb

düzeylerinin >8 gr/dl olması anemiye katkıda bulunan ek bir faktör olmadığını düşündürdü.

MCV'nin normalden düşük olması mikrositozun göstergesidir. Talasemi taşıyıcılığı demir eksikliği anemisinden sonra en sık rastlanan mikrositer anemi nedenidir. Talasemi taşıyıcılığında MCV düzeyini Aksoy ve ark.(81) yaptıkları çalışmada MCV (fl) değerini 60-79, Arpacı ve ark.'nın (82) çalışmasında 59-83, Tanrıverdi ve ark.'nın (83) çalışmasında 60-71, Topal'ın çalışmasında (80) 65-82 arasında, Evrensel'in çalışmasında (101) 56-71 arasında bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda MCV 47.5-74.6 (fl) olup tüm hastalarımızda normalden düşük olarak saptadık.

RDW demir eksikliği anemisinde yüksek, talasemi taşıyıcılığında ise normal ya da hafif yüksektir (60). Hafif demir eksikliği anemilerinin teşhisinde RDW'nin serum demir, ferritin ve transferin saturasyonundan daha duyarlı bir parametre olduğunu ifade edilmiştir (71). Demir eksikliğinin RDW'yi arttıran en sık neden olmasının yanında talasemilerin, diğer hemoglobinopatilerin ve mikrositoza neden olan diğer durumların da RDW'yi arttırabileceğini belirtilmiştir (61). Cook ve ark. (84) demir eksikliği anemisinde ferritini RDW'ye göre daha duyarlı bir test olarak kabul etmişler ve özellikle öncesinde demir tedavisi almamış olanların teşhisinde önemli bir parametre olduğunu belirtmişlerdir. Artaza ve ark.'nın (85) çalışmasında RDW düzeyinin demir eksikliği anemisi ve talasemi taşıyıcılığı ayırımında MCV'den daha duyarlı bir parametre olduğunu ve her ikisinin de tanıda birlikte kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda demir eksikliği olmayan hastalarımızda RDW'nin normal değerlerinin saptanmaması %33,8'inin hafif yüksek (<16.0) ve %66.2'sinin yüksek (≥ 16) olması bu parametrenin ayırıcı tanıda değerli bir parametre olmadığını düşündürmektedir.

Kırmızı küre sayısı talasemi taşıyıcılarında sıklıkla yüksektir. Demir eksikliği anemisinde düşük, normal ya da yüksek olabilmektedir (86). Madan ve ark.'nın (87) 1999 yılında 195 demir eksikliği anemili ve 463 beta talasemi taşıyıcısı üzerinde yaptığı araştırmada, talasemi taşıyıcısı olan grupta RBC'nin artmış olduğunu, fakat anlamlı fark saptamadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda RBC sayısı hastalarımızın %87.7'sinde yüksek, %12.3'ünde düşük bulundu. RBC düşük olan hastalarda saptanan mutasyonlar c27dupG, IVS I-110 G>A heterozigot, IVS I-6 T>C heterozigot, IVS II-745, IVS I-116 T>G heterozigot ve c.316-373 (IVSII-478 C>A heterozigot) idi.

Literatürde RBC düşük olan hastalarda mutasyon incelemesine dair bir çalışmaya rastlamadık. RBC düşük olan hastalarda da talasemi taşıyıcılığı olabileceğini ve talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan bu hastalarda mutasyon analizi çalışılmasının literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Hemoglobin değerlerine göre anemik olduğu saptanan çocuklarda eritrosit ile ilgili diğer parametreler aneminin tipini belirlemek açısından değerlidir. Bunların içinde en yararlısı MCV olmakla birlikte, bu parametreler kullanılarak bazı indeksler de geliştirilmiştir. RDW, RBC, MCV değerleri yanısıra Mentzer ve RDW indeksi talasemi taşıyıcılığı ile demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (86). Mİ talasemi taşıyıcılığında 13'ün altında iken, demir eksikliği anemisinde bu değer 13 ve üzerindedir. Oğuz ve ark.'nın (86) yaptığı bir çalışmada talasemi taşıyıcılığı olan çocuklarda Mİ 7.00-12.20 arasında bildirilmiştir. Rahim ve ark. (88) β -talasemi taşıyıcılarında yaptıkları bir çalışmada ise, Mİ <13 olan 55 hasta ve \geq 13 olan 4 hastada saptamışlardır. Mentzer indeksi beta talasemi taşıyıcılığı ayırımında %95 duyarlı bulunmuştur (88). Demir ve ark. (60) ise ayırıcı tanıda Mİ'nin sensitif ve spesifik olmadığını belirtmişlerdir. Vehapoğlu ve ark. (89) da benzer şekilde Mİ'nin çok yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmadığını fakat diğer indekslerle karşılaştırıldığında demir eksikliği ve BTT ayırımında daha yüksek sensitivite ve spesiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Afroz ve ark. (102) 1998 yılında Karaçi'de 299 öğrenci üzerinde yaptığı bir çalışmada, Mİ'nin beta talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği ayırımında %91 oranında duyarlı olduğunu saptamışlardır. Biz çalışmamızda hastalarımızın Mİ 8.30-17.0 arasında idi. Mİ talasemi taşıyıcılığı düşündürmeyen (\geq 13) 6 hasta vardı. Bu hastalarda saptadığımız mutasyonlar IVS-I 110, c.27dupG (p.Ser10valfs*14), c316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot, -87 C>T Heterozigot idi. Literatürde BTT mutasyonları ile Mİ ilişkisi açısından yapılmış çalışmaya rastlanmadı.

RDW indeksi ve RBC, demir eksikliği anemisi ve BTT ayırımında kullanılan en güvenilir parametrelerdendir. Vehapoğlu ve ark.'nın (89) çalışmasında β -talasemi taşıyıcısı olan hastaların %83'ünde RDW indeksi <220 saptanmıştır. Demir ve ark.'nın (60) 2-16 yaş arasındaki çocuklarda yaptıkları çalışmada ise demir eksikliği anemisi ile BTT ayırıcı tanısında RDW indeksinin en etkin ikinci parametre olduğunu bulmuşlardır. Biz çalışmamızda mutasyonlara göre RDW indekslerini incelediğimizde %94.1'inde RDW

indeksini <220 olarak saptadık. RDW indeksi talasemi taşıyıcılığı düşündürmeyen 4 hasta vardı (RDW indeksi ≥ 220). Bu hastalarda saptanan mutasyonlardan ikisi c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) diğerleri ise c.316-373 (IVS II-478 C>A heterozigot) ve -87 C>T heterozigottur.

Tam kan sayımı parametrelerinde talasemi taşıyıcılığı düşünülen olgularda Hb elektroforezinde HbA2 düzeyi >3.5 olması tanı koydurucudur. Oğuz ve ark.'nın (86) çalışmasında hastaların %100'ünün HbA2 değeri 3.5'in üzerindedir. Hastalarında en düşük HbA2 değerini 4.5, en yüksek 5.8 olarak bildirmişlerdir. Evrensel'in (101) çalışmasında HbA2 değerleri %1.5-5.6 arasında bulunmuştur. Topal (80) hastaların ortalama HbA2 değerini %3.7, Öney ve ark. (1) en küçük HbA2 değerini %3.77 olarak saptamışlardır. Madan ve ark.'nın (87) yaptığı çalışmada ise, Mumbai'de %3.8-7.5, Delhi'de, %3.5-7.5 bulunmuştur. Çalışmamızda en düşük HbA2 düzeyini 2.42 en yüksek ise 6.7 olarak saptadık. Hastalarımızın %93.8'inde HbA2 düzeyi ≥ 3.5 , %6.1 hastada <3.5 idi. Literatürde tam kan sayımı indeksleri BTT düşündüren MCV, HbA2 düzeyi normal olan sessiz BTT'de IVS I-6 T>C, codon 27 G>T, LCR delesyonu gibi mutasyonlar bildirilmiştir. Çalışmamızda HbA2 düzeyi normal olan hastalarda saptadığımız mutasyonlar -87 C>T Heterozigot, IVS II 81 C>T Heterozigot, IVS I-6 T>C Heterozigot, c316-373(IVSII-478 C>A Heterozigot) idi.

Galanello ve ark.'nın (41) çalışmasında -101 C >T, IVS I-6 T>C mutasyonları daha sıklıkla normal veya sınırda HbA2 değerleri ile ilişkili bulunmuştur. Delta globin zincirlerinin azalmış üretimi HbA2 seviyelerinin normalleşmesine neden olabilir (41). Biz yaptığımız çalışmada ortalama HbA2 düzeyi IVS I-110 G>A Heterozigot mutasyonu saptananlarda 4.77 ± 0.71 , IVS I-1 G>A Heterozigot mutasyonu olanlar 5.02 ± 0.98 , IVS I-6 T>C Heterozigot mutasyonu saptananlarda 4.39 ± 0.71 ve IVS II-745 mutasyonu saptananlarda 5.00 ± 0.73 saptadık. Ortalama HbA2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. ($p= 0.424$).

BTT'nin yaklaşık yarısı HbF düzeyi normal, diğer yarısında hafif yüksektir (78). Öney ve ark.'nın (1) yaşları 3-42 arasında değişen 84 BTT hastanın HbF düzeyleri ortalaması % 2.64 (dağılım %0-8.5) bulundu, 6 olguda ise % 4'ün üzerinde olduğunu ifade etmektedir. Bu 6 olgunun β^0 mutasyon tipini taşıdığını saptamışlar ve β^0 mutasyon tipini taşıyan olgularda HbF'in mutasyon tipi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Macaulay (90) ise çalışmasında çok az olgunun % 4-15 arasında HbF değerinin olduğunu bunlarında çoğunun herediter persistan HbF geni taşımaları ile ilgili olabileceğini ileri sürmüştür. Promotor bölge mutasyonu, alfa gen triplikasyonu ve delta gen mutasyonu varlığında HbF olgularda yüksek görülebilmektedir (90). Çalışmamızda HbF düzeyi %35.3 olgunun normal, %46.1 olgunun hafif yüksek (%1-5), % 18.4 olgunun yüksekti (>%5). IVSI-110 G>A heterozigot mutasyonu saptananların %40'ında HbF %1-5 arasında hastaların %41'inde >5 saptandı. IVS I-1 G>A'da ise hiçbir hastanın HbF değeri 5'in üzerinde değildi. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Kutlar ve ark'nın (91) çalışmasında IVS I-1 ve IVS I-II 'de yüksek HbF değerleri saptamışlardır. Çalışmamızda en yüksek saptanan HbF düzeyleri 9.48, 9.7, 13.32, 15.67 olarak saptanmış olup bu bireylerde saptanan mutasyonlar sırasıyla IVS I-116 T>G heterozigot, c.25-26 del AA (p.lys59valfs) heterozigot, IVS I-110 G>A heterozigot, c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14)'dır. Bu mutasyonların üçünde β^0 mutasyon tipi taşımaktadır üçü ekzon 1, biri IVS I-110 G>A heterozigot ise intron 1 'de bulunmakta ve β^+ mutasyon tipindedir. Talasemi taşıyıcılarında HbF yüksekliği saptanan hastalarda bu durumun mutasyon tipleri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (91, 92). Bu sonuçlar bize BTT hastaların bir kısmında HbF düzeyinin mutasyon tipi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. En sık saptanan IVS-I 110 mutasyonu olanlarda farklı sonuçların görülmesi başka faktörlerin etkisi olduğunu göstermektedir.

Beta talasemiler moleküler seviyede heterojendirler, 300'den fazla hastalığa neden olan mutasyon bildirilmiştir. Mutasyonların çoğunluğu çerçeve kaymasına neden olan oligonükleotidlerin tekli nükleotid değişimi, delesyonu veya insersiyonu ile gerçekleşmektedir. Beta talasemi nadir olarak büyük bir gen delesyonu ile ortaya çıkar (41). Yapılan çalışmalara bakıldığı zaman doğudan batıya doğru gidildikçe mutasyon çeşitliliği azalmaktadır. En sık saptanan mutasyon olmakla birlikte IVS-I-110 mutasyonu bilinen Anadolu'daki en eski mutasyon tipidir. Aynı zamanda β globin geninde tanımlanan ilk baz değişimidir (93).

Dünyada da β talasemi mutasyonları ile ilgili pekçok çalışma mevcuttur. Talmaci ve ark.'nın (94) Romanya popülasyonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada IVS I-110 %31.25 ile en sık saptanan mutasyon olup, bunu Codon 39 ve IVS II 745 izlemiştir.

Makhoul ve ark.'nın (95) Lübnan'da yaptığı bir çalışmada yine IVS I-110 %34.2, IVSI-1 %15, IVS 1-6 %14.4 Codon 29 % 9.6 saptamışlardır.

Komşu bazı ülkelere bakıldığında oranlarda farklılıklar olsa da Yunanistan, Makedonya, Bulgaristan ve Suriye'de de gibi en yaygın mutasyon IVS 1-110'dur. İtalya'da en yaygın mutasyon Cd39 iken, İran ve Azerbaycan'da en sık mutasyon IVS II-1'dir. Azerbaycan'da ise saptanan IVS I-110 oranı IVSII-1'e yakındır (95).

Tadmouri ve ark. (29) İstanbul, Adana ve Antakya'da toplam 795 olguda en sık IVS I-110 olmak üzere 31 farklı mutasyon tespit etmişlerdir. Gözlenen diğer mutasyonlar sıklık sırasına göre IVS I-6, Cd8, IVSII-745, IVS I-1, IVS II-1 Cd39, -30, Cd5 ve -28 mutasyonlarıdır. Tadmouri'nin (90) çalışmasında Orta Anadolu Bölgesi civarı IVS1-110 %52.3 ile en sık görülmektedir. Topal ve ark. (80) IVS1-110 mutasyonunu Antakya'da %63.7, Kayseri'de %68.3 ve İzmir'de %46.7 olarak bulmuşlardır. Diğer mutasyonlar sıklık sırasına göre IVS I-1 %18.2, Cd9, IVS 1-6 ve IVS2-1 için % 6 olarak bulunmuştur. Kayseri'de ise IVS I-110 %68.3, Cd8 %19.5, IVS I-10 %46.7 oranında bulunmuştur. İzmir'de ise IVS I-110 %46.7 ile bunu %13.3 ile -30 mutasyonu izlemektedir (80,81). Türkiye genelinde yapılan çalışmalar Öner ve ark.'nın yaygın olarak görülen mutasyon tipleri sıklık sırasına göre; IVS I-110 %42.5, IVS 1-6 %18, IVSII-1 %11.5 Cd8 %7.14 Cd 39 %6, IVSII-745 %4.4, IVS I-1 %2.5, -30 %2.2 Cd 5 %1.1, Atalay ve ark. ise, IVS I-110 %35.9, IVSI-6%21.6, IVS I-1 %13.0, IVSII-745 %3.6, Cd8 %2.2, IVSII-1 %1.4 olarak bildirmişlerdir (31).

Çalışmamızda 17 farklı mutasyon tespit ettik. Sıklık sırasına göre en sık rastladığımız mutasyonlar IVS I-110 (%46.1), IVS I-1 (%12.2), IVS I-6 (%9.8) ve IVSII-745 (%7.3) idi. En sık mutasyonu bölgesel ve Türkiye genelindeki çalışmalarla uyumlu görünse de diğer mutasyonlara bakıldığında farklılıklar tespit ettik. Çalışmamızda önemli bir Akdeniz mutasyonu olan IVS II-745 hastalarımızın %7.3'ünde saptadık. Ancak çalışma esnasında bölgeye özel yeni bir mutasyona rastlamadık.

Çalışmamızda saptanan mutasyonların %70.8'i intronik bölge mutasyonudur. Türk toplumunda en sık görülen IVS 1-110 mutasyonu intron içinde bir ekzon yapışma bölgesi oluşturarak, RNA oluşumu sırasında birinci ekzonun, ikinci ekzona yapışacağı yerde bu bölgeye yapışmasına neden olmaktadır (96). Baysal ve ark.'nın (97) Kıbrıs

bölgesinde yaptıkları bir çalışmada IVS I-110 mutasyonu saptadıkları olguların Hb düzeyleri 10.05-13.65 gr/dl, MCV düzeylerini 62.6-76.4 fl, HbA2 düzeylerini %4.15-5.15, HbF düzeylerini % 0.05-2.35 olarak saptamışlardır. Talmaci ve ark. (94) ise, IVS-I-110 mutasyonu saptadıkları hastaların Hb düzeylerini 11.5-13.5 gr/dl, MCV düzeylerini 63.3-73.4 fl, HbA2 düzeylerini %2.5-5.9, HbF düzeylerini ise % 0-1.7 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda Hb düzeyi 8.0-13.0 gr/dl, MCV düzeyi 47.5-72.0 fl, HbA2 düzeyi %3.7-6.7, HbF düzeyi %0.05-2.35 arasında idi. Bu da bize fenotipik özellikleri belirleyen genotip dışında faktörlerin rolü olabileceğini düşündürdü.

IVS II-1 (G>A) Heterozigot mutasyonu intronik bölge mutasyonu olup Hattori ve ark.'nın (98) çalışmasında bu mutasyon saptanan olgularda Hb düzeyleri 9.3-12.6 gr/dl, MCV düzeyleri 63.4-80.4 fl, HbA2 düzeyleri %4.2-5.6, HbF düzeyleri %0.3-1.2 saptanmıştır. Bu mutasyonun Yemen'den sonra en sık görüldüğü yer Türkiye'dir. Bizim hastalarımızda görülme sıklığını %2.94 olarak saptadık. Bu olguların ortalama Hb düzeyleri 10.1-13.1 gr/dl, MCV düzeyleri 59.7-50.9 fl, HbA2 düzeyleri %5.85-5.90, HbF düzeyleri %2.54-4.49 idi.

IVS I-6 (T>C) Heterozigot mutasyonu da intronik bölge mutasyonudur. Orkin ve ark.'nın (99) çalışmasında bu mutasyon saptanan taşıyıcı olguların Hb düzeyleri 9.55-14.35 gr/dl, MCV 64.7-77.3 fl, HbA2 %3.35-4.45, HbF düzeylerini %0.1-2.2 bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu olguların ortalama Hb düzeyleri 10.2-11.5 gr/dl, MCV düzeyleri 61.70-65.10 fl, HbA2 düzeyleri %3.4-5.24, HbF düzeyleri %0-6.9 idi.

IVS II-745 (C>G) Heterozigot mutasyonu da intronik bölge mutasyonudur. Orkin ve ark.'nın (99) çalışmasında olgularında Hb düzeylerini 9.95-13.05 gr/dl, MCV 64.9-76.5 fl, HbA2 düzeylerini %4.4-5.4, HbF düzeylerini %0.4-2.2 bildirilmiştir. Biz beş hastamızda IVS II-745 mutasyonu saptadık. Bu hastalarımızın Hb düzeyi 9.5-11.1gr/dl, MCV düzeyi 55.3-64.9 fl HbA2 düzeyi %4.4-6.1, HbF düzeyi %0.0-4.0 olarak saptandı. Bu hastaların 3 tanesine c.31 C>T Heterozigot mutasyonu eşlik ediyordu. İtron ve ekzon mutasyonlarının bir arada görüldüğü bu üç olgumuzun eritrosit göstergelerinde anlamlı fark saptamadık.

Tanımlanan ve kapsamlı olarak incelenen ilk mutasyonlardan biri, codon 39'daki mutasyon (CAG-TAG)'dir (100). Bu mutasyon, Akdeniz popülasyonunda beta talasemiye

neden olan ikinci sıklıktaki mutasyondur ve Sardunya'daki β -talasemi vakalarının çoğunluğunu oluşturmaktadır (100). Bizim çalışmamızda ekzon 2'deki mutasyonların %60'ını oluşturan bu mutasyonu üç hastada saptadık.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de anemi önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Demir eksikliği anemisi ülkemizde en sık görülen anemidir fakat tek başına ya da demir eksikliği ile birlikte talasemi taşıyıcılığının ayırt edilmesi halen belli zorluklar taşımaktadır. İki aneminin ayrımının yapılması çocuk hastaları gereksiz demir yükünden kurtaracak, taşıyıcılar için genetik danışma imkanı sağlanmış olacaktır.

Toplumdaki talasemi taşıyıcıları normal görünümde olduklarından özel talasemi testleri yapılmadıkça talasemi taşıyıcısı olup olmadıkları anlaşılabilir. Talasemi riskinin yüksek olduğu bölgelerde toplum taramaları ile talasemi taşıyıcıları tespit edilmelidir.

Beta globin gen mutasyonlarının ortaya çıkarılması β -talasemi erken prenatal tanısı ya da heterozigot bireyleri içeren taşıyıcıların belirlenmesi ve tedavi projeleri için gereklidir.

Sonuç olarak; Aydın ili ve çevresinde BTT tanısı alan çocuklarda 17 farklı mutasyon saptadık. En sık rastlanan dört mutasyon IVS I-110 G>A Heterozigot, IVS I-1 G>A Heterozigot, IVS I-6 T>C Heterozigot ve IVS II-745 idi. Mutasyonların tam kan sayımı parametreleri ve hemoglobin elektroforezi üzerine etkileri değerlendirildiğinde mutasyonların tek başına etkili olmadığı başka faktörlerin de rolünün olabileceği düşünüldü. IVS I-6 (T>C) Heterozigot, c.316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot, IVS II 81 C>T Heterozigot mutasyonlarının normal HbA2 düzeyi ile birlikte olabileceği gözlemlendi. β^0 talaseminin ekzon 1'deki mutasyonları yüksek HbF düzeyi ile seyredebilir. HbA2 düzeyi normal saptanan hastalarda ve HbF düzeyi yüksek (>%5) saptanan hastalarda mutasyon analizi çalışması yapılmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünüldü.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmaya demir eksikliği anemisi olmayan ve BTT tanısı konulan %60'ı erkek, yaş ortalaması 8.34 ± 4.94 yıl olan 65 çocuk alındı.

2. Hastaların tam kan sayımı parametreleri incelendiğinde % 87.7'sinde anemi, % 100'ünde mikrositoz, %49.2'sinde hipokromi, %87.7'sinde RBC yüksekliği saptandı. Tüm olguların %33.8'inde RDW hafif yüksek (<16), %66.2'sinde (≥ 16) yüksek olarak bulundu.

3. RBC sayısı %12.3 hastada düşük bulundu. Bu hastalarda saptanan mutasyonlar c27dupG, IVS I-110 G>A heterozigot, IVS I-6 T>C heterozigot, IVS II-745, IVS I-116 T>G heterozigot ve c.316-373 (IVSII-478 C>A heterozigot) idi.

4. Mutasyonlara göre trombosit sayıları değerlendirildiğinde, trombosit sayıları arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı.

5. HbA2 düzeyi % 93.8 hastada ≥ 3.5 , %6.1 hastada normal saptandı.

6. HbF düzeyi hastaların %35.3'ünde normal (<1), %49.2'sinde hafif yüksek ($1-5$), %18.4'ünde yüksek (>5) saptandı.

7. Hastalarımızda 17 farklı mutasyon tespit edildi.

8. En sık rastlanan mutasyonlar sırasıyla IVS-I 110 (%44.11), IVS I- 1 G>A Heterozigot (%8.8), IVS I-6 T>C Heterozigot (%7.5) ve IVS II-745 (%7.5) idi.

9. Mutasyonlar cinsiyete göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

10. IVS I-110 mutasyonu saptananlarda ortalama Hb düzeyi 10.55 gr/dl, MCV düzeyi 58.44 fl, RDW düzeyi 16.51, RBC düzeyi $5680 \times 10^9/l$, HbA2 düzeyi %4.77, HbF düzeyi %2.34 bulundu.

11. HbA2 normal olanlarda rastlanan mutasyonlar -87 C>T Heterozigot, IVS II 81 C>T Heterozigot, IVS I-6 T>C Heterozigot, c316-373(IVSII-478 C>A Heterozigot) idi.

12. HbF düzeyi $>5\%$ olan mutasyonlar IVS I-110, IVS I-6, C, Codon 39 C>T Heterozigot, IVS I-116, c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot, c.27dupG (p.Ser10valfs*14), c316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot idi.

13. Mİ altı hastada (9.2%) >13 olarak hesaplandı. Bu hastalarda görülen mutasyonlar IVS-I 110, c.27dupG (p.Ser10valfs*14), c316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot idi.

14. RDW indeksi >220 olan dört hasta (6.1%) vardı. Bu hastaların ikisinde c.27dupG (p.Ser10valfs*14) diğerlerinde c.316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot mutasyonları görüldü.

15. Mutasyonların en sık gerçekleştiği gen bölgesi intron 1 bölgesiydi (66.1%).

16. Mutasyonların 89.7% 'sinin doğum yeri Aydın ili idi.

17. HbF düzeyleri 9.48, 9.7, 13.32 ve 15.67 olarak bulunan hastalarda saptanan mutasyonlar sırasıyla IVS I-116 T>G heterozigot, c.25-26 del AA (p.lys59valfs) heterozigot, IVS I-110 G>A heterozigot, c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) idi. Bu mutasyonlardan β^o mutasyon tipi taşıyan üçü ekzon 1'de, β^+ mutasyon tipi taşıyan IVS I-110'da intron 1'de yer almaktadır.

ÖZET

AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDE BETA TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA BETA GLOBİN GEN MUTASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Beta talasemi taşıyıcılığı ülkemizde %2.1 sıklıkta görülmekte olup, demir eksikliğinden sonra en sık görülen anemi nedenidir. Beta talasemi taşıyıcısı olan çocuklarda genotipin fenotip üzerine etkisini gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, Aydın ili ve çevresinde beta talasemi taşıyıcısı çocuklarda, mutasyon çeşitliliğini belirlemek ve bu mutasyonların tam kan sayımı parametreleri ve hemoglobin elektroforezi üzerine etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları ve Çocuk Hematolojisi Polikliniği'nde 01.01.2014-01.08.2019 tarihleri arasında beta talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan ve mutasyon analizi çalışılmış 65 hasta çalışmaya alındı. Tam kan sayımı, hemoglobin elektroforezi ve mutasyon analizi sonuçları bilgisayar veri sistemi ve hasta dosyalarından öğrenildi. Araştırma verileri SPSS 21.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Altmış beş hastanın 39'u (%60.0) erkek, 26'sı (%40.0) kız ve yaş ortalamaları 8.34 ± 4.94 yıl idi. Tam kan sayımı parametreleri incelendiğinde %87.7'sinde anemi, %100'ünde mikrositoz ve RDW yüksekliği, %49.2'sinde hipokromi, %87.7'sinde RBC yüksekliği saptandı. RDW düzeyi %66.2 olguda ≥ 16 idi. On yedi farklı mutasyon tespit edildi. Mutasyonların en sık gerçekleştiği gen bölgesi "intron 1" idi (%66.1). En sık rastlanan mutasyonlar sırasıyla IVS I-110 (%44.11), IVS I-1 G>A Heterozigot (%8.8), IVS I-6 T>C Heterozigot (%7.5) ve IVS II-745 (%7.5) idi. IVS I-110 mutasyonu saptanan hastalarda ortalama Hb düzeyi 10.55 gr/dl, MCV düzeyi 58.44 fl, RDW düzeyi 16.51, RBC düzeyi $5680 \times 10^9/l$, HbA2 düzeyi % 4.77, HbF düzeyi % 2.34 bulundu. HbA2 normal saptanan 4 hastada (%6.1) saptanan mutasyonlar -87 C>T Heterozigot, IVS II 81 C>T Heterozigot, IVS I-6 T>C Heterozigot ve c316-373(IVSII-478 C>A Heterozigot) idi. HbF düzeyi %5'in üzerinde olan 12 hastada saptanan mutasyonlar IVS I-110 (5 kişi), IVS I-6 T>C Heterozigot, Codon 39 C>T Heterozigot, IVS I-116, c.25-26 del AA (p.lys9Valfs) Heterozigot, c.27dupG (p.Ser10valfs*14), c316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot idi. Mentzer indeksi altı hastada (%9.2) >13 olarak hesaplandı. Bu

hastalarda görülen mutasyonlar IVS-I 110, c.27dupG (p.Ser10valfs*14), c316-373 (IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot idi. RDW indeksi >220 olan dört hasta (%6.1) vardı. Bu hastaların ikisinde c.27dupG (p.Ser10valfs*14) diğerlerinde c316-373(IVS II-478 C>A Heterozigot), -87 C>T Heterozigot mutasyonları görüldü. HbF düzeyi 9.48-15.67 aralığında saptanan dört hastada saptanan mutasyonlar IVS I-116 T>G heterozigot, IVS I-110 G>A heterozigot, c.25-26 del AA (p.lys59valfs) heterozigot, c.27 dupG (p.Ser10 valfs*14) idi ve bu mutasyonlardan β^0 mutasyon tipi taşıyan üçü ekzon 1'de, β^+ mutasyon tipi taşıyan biride (IVS I-110) intron 1'de yer almaktaydı.

Sonuç: BTT hastalarında saptanan aynı mutasyonların tam kan sayımı parametreleri, Hb A2 ve HbF düzeyleri üzerine farklı etkilerinin olması, fenotip üzerine bu mutasyonların tek başına etkili olmadıklarını, başka faktörlerinde rolünün olabileceğini ve bu faktörlerin aydınlatılması gerektiğini bize düşündürdü. RBC düşük, Mentzer indeksi ≥ 13 ve RDW indeksi ≥ 220 , HbA2 <3.5 olan olgularda da BTT olabileceği ve bu hastalarda mutasyon analizi çalışılmasının literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Beta Talasemi Taşıyıcılığı, Tam Kan Sayımı Parametreleri, Beta Globin Gen Mutasyonları, Hemoglobin Elektrofrezisi.

İletişim Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Tel: 444 12 56

ilgun_deniz@hotmail.com

ABSTRACT

EVALUATION OF BETA GLOBIN GENE MUTATIONS IN BETA THALASSEMIA TRAIT CHILDREN IN AYDIN PROVINCE AND ITS ENVIRONMENT

Objective: Beta thalassemia trait is seen in 2.1% of our population and is the most common cause of anemia after iron deficiency. There are few studies showing the effect of genotype on phenotype in children with beta thalassemia traits. The aim of this study was to determine the diversity of mutations in children with beta thalassemia in and around Aydın and to evaluate the effects of these mutations on complete blood count parameters and hemoglobin electrophoresis.

Materials and Methods: Sixty-five patients diagnosed with beta thalassemia carriage between 01.01.2014-01.08.2019 in Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics and Pediatric Hematology were included in the study. Complete blood count, hemoglobin electrophoresis and mutation analysis results were obtained from computer data system and patient files. Data were analyzed using SPSS 21.0 statistical program.

Results: Of the 65 patients, 39 (60.0%) were male, 26 (40.0%) were female, and the mean age was 8.34 ± 4.94 years. When the complete blood count parameters were examined, 87.7% had anemia, 100% had microcytosis and RDW elevation, 49.2% had hypochromia and 87.7% had RBC elevation. RDW level was ≥ 16 in 66.2% of the cases. Seventeen different mutations were detected. The gene region where mutations occur most frequently was on intron 1 (66.1%). The most common mutations were IVS I-110 (44.11%), IVS I-1 G>A Heterozygote (8.8%), IVS I-6 T>C Heterozygote (7.5%) and IVS II-745 (7.5%), respectively. The mean Hb level was 10.55 gr/dl, MCV level 58.44 fl, RDW level 16.51, RBC level $5680 \times 10^9/l$, HbA2 level 4.77%, HbF level was 2.34% in patients with IVS I-110 mutation. Mutations detected in four patients (6.1%) with normal HbA2 were -87 C>T Heterozygote, IVS II 81 C>T Heterozygote, IVS I-6 T>C Heterozygote and c316-373 (IVSII-478 C>A Heterozygote). Mutations detected in 12 patients with HbF levels above 5% IVS I-110 (5 persons), IVS I-6, C, Codon 39 C>T Heterozygous, IVS I-116, c.25-26 del AA (p. lys9Valfs) Heterozygote, c.27dupG (p.Ser10valfs * 14), c316-373

(IVS II-478 C>A Heterozygote), -87 C>T Heterozygote. The Mentzer index was calculated as >13 in six patients (9.2%). The mutations seen in these patients were IVS I-110, c.27dupG (p.Ser10valfs * 14), c316-373 (IVS II-478 C> A Heterozygote), -87 C> T Heterozygote. There were four patients (6.1%) with an RDW index >220 . Two of these patients had c.27dupG (p.Ser10valfs * 14) and others had c316-373 (IVS II-478 C>A Heterozygote), -87 C>T Heterozygote mutations. Mutations detected in four patients whose HbF levels were between 9.48-15.67 IVS I-116 T>G heterozygote, IVS I-110 G>A heterozygote, c.25-26 del AA (p.lys59valfs) heterozygote, c.27 dupG (p.Ser10) the valve was * 14) and three of these mutations were located in exon 1 with β^0 mutation type and one in IVS I-110 with intron 1.

Conclusion: The same mutations detected in BTT patients had different effects on complete blood count parameters, HbA2 and HbF levels, suggesting that these mutations are not effective on the phenotype alone, may have a role in other factors, and these factors should be elucidated. We think that BTT may also be present in patients with low RBC, Mentzer index ≥ 13 and RDW index ≥ 220 , HbA2 <3.5 , and the study of mutation analysis in these patients will contribute to the literature.

Key Words: Beta Thalassemia Trait, Complete Blood Count Parameters, Beta Globin Gene Mutations, Hemoglobin Electrophoresis.

Contact Address: Adnan Menderes University Training and Research Hospital
Department Of Pediatrics, Tel: 444 12 56

KAYNAKLAR

1. Öney S, Öztürk Z, Küpesiz A, Keser İ, Yeşilipek MA. Beta-talasemi taşıyıcılarında beta-globin gen mutasyon tipi ve hematolojik fenotip arasındaki ilişki. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi* 2008; 2(4): 23-8.
2. Gülbay G, Yeşilada E, Aydoğdu İ, Özgen Ü, Otlu G. Malatya'da beta talasemi mutasyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2009; 16(4): 209-12.
3. Moghaddam EM, Bahrami S, Naderi M, Bazi A, Karimipoor M. Xmn 1-158 γ G variant in β -thalassemia intermediate patients in southeast of Iran. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2017; 11(2): 165-71.
4. Thein SL. Structural variants with a beta-thalassemia phenotype. In: Stinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagl RL (eds). *Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001; 342-55.
5. Cavdar AO, Arcasoy A. The incidence of beta-thalassemia and abnormal hemoglobins in Turkey. *Acta Hematol* 1971; 45(5): 312-8.
6. Ho PJ. The regulation of β -globin gene expression and β -thalassemia. *Pathology* 1999; 31(4): 315-24.
7. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112(10): 3927-38.
8. Sümer P. Kahramanmaraş ilinde alfa talasemi genotipleri: Moleküler çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2016.
9. Günçag D. Hemolitik anemiler. In: Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Besisik SK (eds). *Klinik hematoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 87-152.
10. Weatherall DJ. Disorders of globin synthesis: The thalassemias. In: Lichtman MA, Beutler E, Klippis TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill, 2006: 633-66.
11. Flint J, Harding SM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Bailliers Clin Haematol* 1993; 6: 215-61.

12. Fathallah H, Atweh FG. DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews*. 2006; 20: 227-34.
13. Olivieri NF. The β -thalassemias. *Medical progress* 1999; 341: 99-109.
14. Antonini E, Brunoria M. Hemoglobin. *Annu Rev Biochem* 1970; 39: 977-1042.
15. Schroeder WA. The hemoglobins. *Ann Rev* 1963; 32: 301-20.
16. Huehns ER. Diseases due to abnormalities of hemoglobin structure. *Annu Rev Med* 1970; 21: 157-78.
17. Antonarakis SE, Boehm CD, Giardina PJ, Kazazian HH. Non random association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79 (1): 137-41.
18. Nagel RL. Disorder of hemoglobin function and stability. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: Principles and practice of hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2003; 1597-654.
19. May C, Sadelain MA. Promising genetic approach to the treatment of β -thalassemia. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 276-80.
20. Maxwell TJ. Applications of evolutionary theory to genotype/phenotype association studies. Doctoral thesis. Washington University, 2006.
21. Wood WG. Increased HbF in adult life. *Bailliers Clin Haematol* 1993; 6: 177-213.
22. Kazazian HH, Boehm C. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* 1998; 72: 1107-16.
23. Weatherall D. The thalassemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 385-92.
24. Rund D, Rachmilewitz E. Pathophysiology of α - and β - thalassemia: Therapeutic implication. *Sem Hematol* 2001; 38(4): 343-9.
25. Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH. Nonuniform recombination within the human β -globin gene cluster. *Am J Hum Genet* 1984; 36(6): 1239-58.

26. Kayıslı ÖG, Keser İ, Canatan D, Sanlıoğlu A, Özces ON, Lüleci G. Identification of a novel frameshift mutation [Codon 3 (+T)] in a Turkish patient with beta-thalassemia intermedia. *Turk J Med Sci* 2005; 35(3) 175-77.
27. Altay Ç, Gürgey A. Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Tr J Pediatr* 1986; 28: 218-29.
28. Başak AN. Moleküler tanı ve yöntemleri. In: Canatan D, Aydınok Y (eds). 3. uluslararası talasemi yaz okulu & avrupa transfüzyon tıbbı okulu. İstanbul, 2004; 199-206.
29. Tadmouri GO. Beta-thalassemia in Turkey: distribution, diversity, evolution and phenotype-genotype correlations. Doktora tezi, İstanbul, 1999.
30. Arcasoy A. Türkiye’de talassemia taşıyıcı sıklığı ve anormal hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, 1994.
31. Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan G, Gümrük F. Beta-thalassemia mutations in the east of Turkey. *Tr J Haematol* 2001; 18(4): 239-42.
32. Arıyürek SY. Konya bölgesinin anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tiplerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 2009.
33. Weatherall PH, Clegg JB. Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull WHO* 2001; 79(8): 704-12.
34. Huisman THJ, Carver MFH. The β and δ thalassemia repository. *Hemoglobin* 1998; 22(2): 169-95.
35. Falchi A, Giovannoni L, Vacca L, Latini V, Vona G, Varesi L. Beta globin gene cluster haplotypes associated with beta-thalassemia on corsica island. *Am J Hematol* 2005; 78(1): 27-32.
36. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haem* 2004; 26(3): 159-76.
37. Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herorts H, Demaine A, Papiha S, Hedges R, Bandelt HJ, Sykes B. Paleolithic and neolithic lineages in the european mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet* 1996; 59(1): 185-203.

38. Beta Talasemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Türk Hematoloji Derneği, 2011.
39. Perea FJ, Magan MT, Cobian JG, Sanchez-Lopez JY, Chavez ML, Zamudio G, Esparza MA, Lopez-Guido B, Ibarra B. Molecular spectrum of β -thalassemia in the Mexican population. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2004; 33(2): 97-158.
40. Forget BG, Olivieri NF. Hemoglobin synthesis and the thalassemias. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: Principles and practice of hematology*. Lippincott Williams&Wilkins, USA, 2003; 1503-96.
41. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010; 12(2):61–76.
42. Treisman R, Orkin SH, Maniatis T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned beta-thalassaemia genes. *Nature* 1983; 302(5909): 591-96.
43. Rund D, Oron-Karni V, Filon D, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Oppenheim A. Genetic analysis of beta-thalassemia intermedia in Israel: diversity of mechanisms and unpredictability of phenotype. *Am J Hematol*. 1997; 54(1): 16-22.
44. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27(3): 209–28.
45. Weatheral DJ, Clegg JB. Historical perspectives: the many and diverse routes to our current understanding of the thalassemias. In: Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG (eds). *The thalassemia syndromes*, 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001; 3-62.
46. Weatheral DJ, Clegg JB. *The thalassemias*, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.
47. Weatheral Dj. The Thalassemias. In; Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H (eds). *The molecular basis of blood diseases*, 3th ed. Philadelphia: WB Saunders company, 2001; 183–226.
48. Fu XH, Liu DP, Liang CC. Chromatin structure and transcriptional regulation of the β -globin locus. *Exp Cell Res* 2002; 278: 1–11.
49. Weatheral DJ. The Thalassemias. In: Bentler E, Collier BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligshn U (eds). *Williams Hematology*, 6th ed. New York: Mc Graw Hill Publishing, 2001; 547-80.

50. Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G. Locus control regions. *Blood* 2002; 100: 3077–86.
51. Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A. Molecular characterization of β -thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 422–26.
52. Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ. Advances in thalassemia research. *Blood* 1984; 63(4): 738–58.
53. Weatherall DJ. Phenotype–genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Genetics* 2001; 2: 245-55.
54. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu Rev Genet* 1980; 14: 145-78.
55. Orkin SH, Kazazian HH. The mutation and polymorphism of the human globin gene and its surrounding DNA. *Ann Rev Genet* 1984; 18: 131-71.
56. Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 2005; 33(3): 259-71.
57. Capellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A. Guidelines for the clinical management of thalassemia. 2nd revised edition. Nicosia (CY): Thalassemia International Federation, 2008.
58. Yardumian A, Telfer P, Darbshire P. Standards for the Clinical Care of Children and Adults with Thalassaemia in the UK. 2nd edition. United Kingdom. Chapter 2. Thalassemia: Clinical features and treatment, 2008.
59. Hermiston ML, Mentzer WC. A practical approach to the evaluation of the anemic child. *Pediatr Clin North Am* 2002; 49: 877-91.
60. Demir A, Yarali N, Fisgin T, Duru F, Kara A. Most reliable indices in differentiation between thalassemia trait and iron deficiency anemia. *Pediatr Int* 2002; 44: 612-16.
61. Shine JW. Microcytic anemia. *Am Fam Physician* 1997; 55(7): 2455-62.
62. Ünal S, Yetkin S. Demir eksikliği anemisi. *Katkı Pediatri Dergisi* 2003; 25(3-4): 327-45.

63. Mazza P, Amurri B, Lazzari G, Masi C, Palazzo G, Spartera MA, Giua R, Sebastio AM, Suma V, De Marco S, Semeraro F, Moscogiuri R. Oral iron chelating therapy. A single center interim report on deferiprone (L1) in thalassemia. *Haematologica* 1998; 83(6): 496-501.
64. Altay Ç, Oner C, Oner R, Gumruk F, Mergen H, Gurgey A. Effect of alpha-gene numbers on the expression of beta-thalassemia intermedia, beta-thalassemia and $\delta\beta^0$ -thalassemia traits. *Hum Hered* 1998; 48: 121-5.
65. Altay Ç. Abnormal Hemoglobins in Turkey. *Turk J Haematol* 2002 5; 19(1): 63-74.
66. Glader B. Anemias In: Behrman R, Kliegman R, Jenson H (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed. Pennsylvania: Saunders 2004: 1604-06.
67. Koç A, Kösecik M, Vural H, Erel Ö, Ataş A, Tatlı MM. The frequency and etiology of anemia among 6-16 years of age children in southeast region of Turkey. *Turk J Pediatr* 2000; 42: 91-5.
68. Doğru D, Öztürk R, Çamur S. Anemili hastaya yaklaşım. In: Özalp I (ed). *Katkı Pediatri Dergisi* 1995; 16(3): 251-64.
69. Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Rev* 2002; 16: 81-85.
70. Oner R, Birben E, Acar C, Oner C, Kara A, Gumruk F, Gurgey A, Altay C. Molecular analysis of turkish beta-thalassemia heterozygotes with normal HbA2 levels. *Hemoglobin* 2000: 195-201.
71. Oski F. Iron deficiency in infancy and childhood. In: Desforjes J (ed). *New Eng J Med* 1993; 329(3): 190-3.
72. Weatherall DJ. Disorders of globin synthesis. In: Litchman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). *Williams Hematology, The thalassemias*. USA: McGraw-Hill, 2006: 633-41.
73. Çürük MA. Hemoglobinopatilerde tarama ve tanı yöntemleri neler olmalı? In: Canatan D, Aydınok Y (eds). 3. Uluslararası Talasemi YazOkulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 2004; 157-68.

74. Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. In: Scriver CR, Beaudet A, William SS, Valle D. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. New York: McGraw-Hill, 2001; 3-45.
75. Tadmouri GO, Yüksel L, Başak AN. HbS/beta(del)-thalassemia associated with high levels of hemoglobins A2 and F in a Turkish family. *Am J Hematol* 1998; 59(1): 83-6.
76. Tadmouri GO, Başak AN. β -Thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular and evolutionary aspects. *Hemoglobin* 2001; 25(2): 227-39.
77. Tadmouri GO, Garguier N, Demont J, Perrin P, Başak AN. History and origin of beta-thalassemia in Turkey: sequence haplotype diversity of beta-globin genes. *Hum Biol* 2001; 73(5): 661-74.
78. Bain BJ. *Haemoglobinopathy Diagnosis*, Second Edition. 2006; 36-138.
79. Basak AN. Talasemi moleküler genetiği. *Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu* 2005; 99-106.
80. Topal K. Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde beta-talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Doktora tezi, Adana: Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.
81. Aksoy K, Çürük MA, Arpacı A, Dikmen N, Yüregir GT. Beta talasemili bir ailenin mutasyon tipinin dot-blot hibridizasyon yöntemi ile saptanması. *ÇÜ Sağlık Bil Der* 1992; 7: 87-91.
82. Arpacı A, Aksoy K, Yüregir GT. Preliminary studies for prenatal diagnosis: incidence and mutation site of beta thalassemia in Antakya, Türkiye. *Ann Med Sci* 1992; 1: 103-10.
83. Tanrıverdi K. β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. Bilim uzmanlığı tezi, Adana: Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
84. Cook J, Skikne BS, Baynes RD. Iron deficiency: the global perspective. In: Hershko C (ed). *Progress in Iron Research*. New York, NY: Plenum Press 1994: 219-28.

85. Artaza RJ, Carbia CD, Ceballo MF, Diaz NB. Red cell distribution width (RDW): Its use in the characterization of microcytic and hypochromic anemias. *Medicina (B Aires)*. 1999; 59(1): 17-22.
86. Oğuz F, Uzunhan TA, Binnetoğlu FK, Vehid HE. Hipokrom mikrositer anemide demir eksikliği anemisi ve talasemi taşıyıcılığı oranları. *Çocuk Dergisi* 2009; 9(3): 116-22.
87. Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U, Kela K. Red cell indices and discriminant functions in the detection of thalassemia trait in a population with high prevalence of iron deficiency anemia. *Indian J Pathol Microbiol* 1999; 42(1): 55-61.
88. Rahim F, Keikhaei B. Better differential diagnosis of iron deficiency anemia from beta-thalassemia trait. 2009; 26(3): 138-45.
89. Vehapoğlu A, Ozgurhan G, Demir AD, Uzuner S, Nursoy MA, Türkmen S, Kacan A. Hematological indices for differential diagnosis of beta thalassemia trait and iron deficiency anemia. *Anemia*, 2014.
90. Altay Ç. The hemoglobinopathy problem in turkey. *Tepecik Eđit Hast Derg* 1993; 3(1): 1-8.
91. Kutlar A, Kutlar F, Gu LG, Mayson SM, Huisman TH. Fetal hemoglobin in normal adults and β -thalassemia heterozygotes. *Hum Genet* 1990; 84(1): 106-10.
92. Lemsaddek W, Picanco I, Seuanes F. Spectrum of beta thalassemia mutations and HbF levels in the heterozygous Moroccan population. *Am J Hematol* 2003; 73(3): 161-8.
93. Westaway D, Williamson R. An intron nucleotide sequence variant in a cloned β^+ -thalassaemia globin gene. *Nucleic Acids Research*, 1981; 9(8): 1777-88.
94. Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrilă L. Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2004; 8(2): 232-40.
95. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA. Genetic heterogeneity of beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann Hum Genet* 2005; 69(1): 55-66.
96. Özkınay F. Hemoglobinopatilerde genetik patoloji ve moleküler tanı yöntemleri. *HematoLog*. 2014; 4(1): 11-23.

97. Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Berkalp A, Aritkan E, Old JM, Ioannou P, Angastiniotis M, Droushiotou A, Yüregir GT, Kiliç Y, Huisman THJ. The β -thalassemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haematol* 1992; 81: 607-09.
98. Hattori Y, Yamamoto K, Yamashiro Y, Ohba S, Miyamura S, Yamamoto K, Matsuno Y, Morishita M, Miyaji T, Era T. Three β -thalassemia mutations in the Japanese: IVS-II-1 (G \rightarrow A). IVS-II-848 (C \rightarrow G), and codon 90 (GAG \rightarrow TAG). *Hemoglobin*. 1992; 16(1-2): 93-7.
99. Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. Linkage of beta thalassemia mutations and beta globin genopolymorphism with DNA polymorphism in human beta globin. *Nature* 1982; 296(5858): 627-31.
100. Takeshita K, Forget BG, Scarpa A, Benz EJ Jr. Intranuclear defect in beta-globin mRNA accumulation due to a premature translation termination codon. *Blood*. 1984; 64(1): 13-22.
101. Evrensel EE. Kayseri bölgesindeki beta talasemi mutasyon tipleri. Uzmanlık tezi, Adana: Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya AD, 2002.
102. Afroz M, Shamsi TS, Syed S. Predictive value of MCV/RDW count ratio to discriminate between iron deficiency anaemia and beta thalassemia trait. *Journal of Pakistan Medical Association*. 1998; 48(18): 18-9.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Formu

ADÜ Evrak Tarih ve Sayısı: 27/09/2019-E.59390



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 53043469-050.04.04
Konu : Kararlar

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL
Öğretim Üyesi

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26.09.2019 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmamızla ilgili alınan 5 nolu karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize sunarım.

e-İmzalıdır
Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR
Kurul Başkanı

KARAR 5
Protokol No : 2019/155
Sorumlu Yürütücü : Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL'ın "Aydın ili ve çevresinde beta talasemi taşıyıcısı çocuklarda beta globin gen mutasyonlarının değerlendirilmesi" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.
Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Evrakı Doğrulamak İçin: <https://ebys.adu.edu.tr/en/Vision/Dogrula/8ABM5DH>

Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüs Tıp Fakültesi Merkez Kampüs Kepez
Mevki 09010 Efeler/Aydın
Telefon No: 0256 225 31 66 / 4506 Faks No: 0256 212 31 69

Bilgi İçin: Tuğba Boğa

Unvan: Bilgisayar İşletmeni

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 2. Olgu-Rapor Formu

Olgu Rapor Formu/Veri Takip Raporu

Doğum tarihi/Yaşı :

Doğum yeri :

Cinsiyet :

Hb:

Hct:

RBC:

MCV:

MCHC:

RDW:

HbA2:

HbF:

Hastada Saptanmış Olan Beta Globin Mutasyonu: