



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BETA TALASEMİ MAJÖRLÜ HASTA VE EBEVEYNİNDE
MUTASYON ANALİZİ

Dr. CEMAL POLAT
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

DİYARBAKIR-2014



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BETA TALASEMİ MAJÖRLÜ HASTA VE EBEVEYNİNDE
MUTASYON ANALİZİ

Dr. CEMAL POLAT
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

Prof. Dr. NURİYE METE
(TEZ DANIŞMANI)

DİYARBAKIR-2014

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın gerçekleşmesinde büyük emeği geçen başta Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Nuriye METE ve Doç. Dr. Osman EVLİYAOĞLU olmak üzere metodun kurulmasındaki katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e, Anabilim Dalımızdaki Öğretim Üyelerine, laboratuvar çalışanlarına ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Bu çalışmayı değerli annem ve babama ithaf ediyorum.

Dr. Cemal POLAT

Kasım 2013

ÖZET

Bu çalışmada, bölgemizde beta talasemi majör tanısı almış hasta ve ebeveynlerinde; tanıyı kesinleştirmek için, hematolojik analiz ve hemoglobin varyant analizi yapıldı. Altın standart DNA dizi analizi yöntemi ile de mutasyon çeşitliliği saptandı.

Hastanemizin Pediatrik Hematoloji Bölümünde takip ve tedavisi yapılan 30 beta talasemi majör hasta ve ebeveynlerden (30 anne ve 30 baba) olmak üzere toplam 90 kişi çalışmaya dahil edildi. EDTA' lı tüplere kan örnekleri alındı. Hematolojik analiz flow sitometrik yöntemle, hemoglobin varyant düzeyi HPLC ile aynı gün çalışıldı. Mutasyon çeşitliliğini saptamak için DNA dizi analizi yapıldı.

Sıklık sırasına göre: IVS-I-110 (G->A) % 46.67, Kodon 8 (-AA) % 16.67, IVS-II-1 (G->A) % 11.67, Kodon 44 (-C) % 10.00, IVS-II-745 (C->G) % 5.00, IVS-I-1 (G->A) % 3.33, IVS-I-5 (G->T) % 3.33 ve -30 (T->A) % 3.33 olmak üzere 8 çeşit mutasyon tespit edildi. Bunlara ek olarak önceden tanımlanmış dört sessiz nokta mutasyon görüldü. Hastalar düzenli olarak transfüzyon tedavisi aldıkları için hemoglobin konsantrasyonu 9.20 ± 1.32 g/dL düzeyi ile beklenen düşüklükte değildi. HbA 86.32 ± 12.09 , HbF 10.95 ± 11.94 olarak saptandı. Ebeveynlerde ise taşıyıcılarda olması beklenen hemogram sayımı ve Hb varyant düzeyleri görüldü.

Beta talasemi mutasyon çeşitliliği açısından Türkiye geneline benzer bir dağılım tespit edildi. 9.20 ± 1.32 g/dL olarak saptanan Hb düzeyi ise hastaların takip-tedavilerinin etkin sürdürüldüğünü düşündürmektedir. Bu çalışma, DNA dizi analizi yönteminin kullanımına bağlı olarak Diyarbakır'da saptanamayan mutasyonların belirlenmesine imkan tanımıştır. Bundan sonra daha geniş çaplı taramaların yapılarak mutasyonların saptanması gerçek bölgesel verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Taşıyıcı sıklığının yaygın olduğu bölgemizde bilinmeyen mutasyonların saptanması, prenatal tanı ile hasta çocuk doğumunun önlenmesine önemli katkı sunacaktır.

Anahtar Sözcükler: Talasemi, beta talasemi, dizi analizi, mutasyon, HPLC, SNP

ABSTRACT

In this study, patients diagnosed with beta thalassemia and their parents were subjected to hematological and hemoglobin variant analysis. Mutation diversity had been determined with the gold standart method DNA sequencing.

A total of 90 people, 30 of them beta thalassemia major patients that have been followed-up and treated in Hematology Clinics of Dicle Üniversity Medical School Hospital and 60 of them were their parents, included in the study. Blood samples of both of patients and their parents into two EDTA containing tubes for all analyses. Hematological analysis had been performed with flowcytometric method and mutations with DNA sequencing.

8 different mutations were determined. By frequency: IVS-I-110 (G->A) % 46.67, Codon 8 (-AA) % 16.67, IVS-II-1 (G->A) % 11.67, Codon 44 (-C) % 10.00, IVS-II-745 (C->G) % 5.00, IVS-I-1 (G->A) % 3.33, IVS-I-5 (G->T) % 3.33 ve -30 (T->A) % 3.33. In addition to these mutations, four missense single nucleotide polymorphisms were determined. Due to the transfusion therapy, diversity was noticed in hemoglobin concentration (9.20 ± 1.32 g/dL) and Hb variants levels (HbA 86.32 ± 12.09 , HbF 10.95 ± 11.94). Typical carrier hemogram count and Hb variants levels were seen in parents.

In our study, a similar distribution was identified throughout Turkey in terms of mutations. Mutations were classified in all the studied people. Average Hb level of 9.20 ± 1.32 g/dL shows a sufficient follow-up and treatment of the disease. This study increased the resolution of mutation detection in Diyarbakır due to the use of DNA sequencing. Thereafter large scale mutation detection studies will help to screen realistic regional data in terms of mutation diversity of beta thalassemia. Determination of unknown mutations in our region, where carier frequency is realtively high, will help to prevent birth of diseased children via prenatal diagnosis.

Key Words: Thalassemia, beta thalassemia, sequence analysis, mutation, HPLC, SNP

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
DIŞ KAPAK	i
BOŞ SAYFA.....	ii
İÇ KAPAK SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2. Gen Ekspresyonunun Temeli	6
2.2.1. Globin gen kümeleri.....	7
2.3. Talasemiler	9
2.3.1. β -Talasemi	9
2.3.2. β -Talasemiye neden olan mutasyonlar	10
2.3.3. β -Talasemilerde patofizyoloji	15
2.3.4. β -Talasemilerde fenotipler ve klinik formlar	17
2.3.5. β -Talasemi tanısı	20
2.3.6. Prognoz.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.1. Gereçler	22
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	22
3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	23
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. Hemogram düzeyleri	24
3.3.2. Hb varyant düzeyleri	25
3.3.3. Moleküler gen analizi.....	27
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇLAR	54
7. KAYNAKLAR	56
BOŞ SAYFA.....	62
ARKA DIŞ KAPAK	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

α :	Alfa
β :	Beta
δ :	Delta
ε :	Epsilon
γ :	Gama
γ^A :	Gama Alanin
γ^G :	Gama Glisin
μL :	Mikro litre
Ψ :	Pseudo
θ :	Theta
ζ :	Zeta
aa :	Amino asit
bp :	Baz çifti
BT :	Beta talasemi
BTI :	Beta talasemi intermedia
BTM :	Beta talasemi major
BTT :	Beta talasemi taşıyıcı (minör)
CO ₂ :	Karbondioksit
dk :	Dakika
DNA :	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP :	Deoksi Nükleotit Trifosfat
EDTA :	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
F:	Forward
Hb :	Hemoglobin
Hct :	Hematokrit
HPLC :	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HS :	Hypersensitive Site
IVS :	İntronlar, intervening sequences
Kb :	Kilo baz
L :	Litre
LCR :	Locus Control Region
MCH :	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC :	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV :	Ortalama eritrosit hacmi
Maks:	Maksimum
Min :	Minumum
mRNA :	Mesajcı Ribonükleik Asit
nm :	Nanometre
O ₂ :	Oksijen
OD :	Optik Dansite
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RBC :	Eritrosit
R:	Reverse
RDW :	Eritrosit dağılım genişliği
RNA :	Ribonükleik asit

s. saniye
SD : Standart Sapma
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
X : Ortalama
UTR : Untranslate Region

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Thalassemia, Yunanca'da thalassa (deniz) ve haima (kan) kelimelerinden türetilmiştir. Beta talasemi (BT), 11. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan, β -globin geninde meydana gelen mutasyon sonucunda oluşan otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (1-3).

Talasemi dünyada sıklıkla görülmekte olup, Akdeniz Ülkeleri, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan, Güney Çin ve Uzak Doğu, Kuzey Afrika kıyıları ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülmektedir. En yüksek insidans Kıbrıs (% 14), Sardunya (% 10.3) ve Güneydoğu Asya'da bildirilmiştir (3). Dünya nüfusunun yaklaşık % 1.5'i BT taşıyıcısıdır ve Dünya nüfusu 7 milyar üzerinde olduğu kabul edildiğine göre yaklaşık 100 milyon üzerinde taşıyıcı mevcuttur (3,4).

Türkiye'de Çavdar ve Arcasoy tarafından talasemi sıklığını gösteren ilk çalışmalar yapılmış ve ortalama insidansı % 2.1 ve bazı bölgelerde ise insidansın % 0.6-11.7 arasında olduğu bildirilmiştir (5). Türkiye'de yaklaşık 1.400.000 taşıyıcı ve 5000 civarında hasta vardır. Her yıl yüzlerce hastalıklı çocuk dünyaya gelmekte, aileler ve toplum maddi ve manevi zarara uğramaktadır.

BT hastaları, klinik ve laboratuvar verileri ışığında tespit edilmektedir. Hemogram sayımı ve hemoglobin (Hb) varyant düzeyi, Hb elektroforezi rutin yapılan testlerdir. Mutasyon analizi için kullanılan yöntemlerden DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) dizi analizi bugün altın standart olarak kabul edilmektedir (3).

BT'de mutasyon çeşitliliğinin belirlenmesi, hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde önemlidir. Dünya'da BT mutasyonlarının moleküler düzeyde incelenmesi sonucunda şimdiye kadar 200'den fazla çeşit mutasyon tespit edilmiştir (6,7). Türkiye'de ise 40 dan fazla çeşit BT mutasyonu görülmüş olup mutasyon tipleri Türkiye'nin bölgeleri arasında farklılıklar göstermektedir (8,9).

Bu çalışmada hemogram ve Hb elektroforez yöntemi ile BTM tanısı almış hastalarda ve ebeveynlerinde; hemogram sayımı, HPLC ile Hb varyant düzeyi ve altın standart dizi analizi yöntemiyle mutasyon çeşitliliği saptandı.

BT'nin şimdiye kadar kemik iliği nakli dışında kesin tedavisi bulunmamaktadır (3). Akraba evliliklerin sık olduğu ülkemizde hem maddi hem de manevi açıdan büyük sorunlar oluşturduğu göz önüne alındığında koruyucu sağlık

hizmetlerin önemi anlaşılmaktadır. Prenatal tanı, evlilik öncesi tarama, genetik danışmanlık, hastalık hakkında bilgilendirme hizmetleri büyük önem kazanmaktadır. Taşıyıcıların tesbiti ve bilgilendirilmesi ile hasta çocuk doğumunun önlenmesi çok önemlidir.

Bu çalışmada, beta talaseminin moleküler düzeyde tanısını sağlayacak yöntemi laboratuvarımıza kurularak bölgemizin ihtiyacı olan bu hizmetin sunulması, BTM tanısıyla takip ve tedavisi planlanan hastaların tanısının kesinleştirilmesi ve tedavisine katkıda bulunulması, prenatal tanı ile hasta çocuk doğumunu önlemesi amaçlandı.

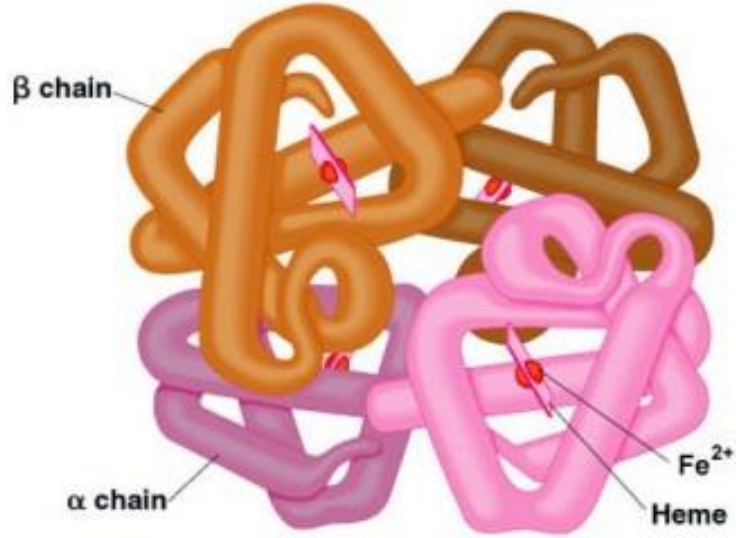
2. GENEL BİLGİLER

Talasemiler, Hb tetramerini oluşturan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkarlar. Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ (ϵ = epsilon) talasemi olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β -talasemidir. α -talasemi Uzak Doğuda sıklıkla görülürken, BT Türkiye' yi de içine alan Akdeniz Ülkelerinde siktir (2,10). Günümüzde BT' ye yol açan moleküler defektler oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Hastalığın en önemli nedenini, α -talasemide görülen büyük delesyonlar aksine, genellikle gen içindeki nokta mutasyonları oluşturur. Rutin kullanıma giren PCR yöntemi ve direkt DNA dizi analizi ile BT' ye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla artarak 200'ü geçmiştir (1,6,11,12). Bu geniş moleküler çeşitliliğin tümünün her toplumda görülmemesi, mutasyonların etnik gruplara özgün olmasından kaynaklanmaktadır. Genelde bir toplumda görülen BT mutasyonların % 90-95'ini az sayıda mutasyon çeşidi oluşturmaktadır. Allel çeşitliliği Sardunya adası, Kıbrıs gibi küçük ve izole etnik gruplarda daha da azalmaktadır. Türkiye toplumunda 40 dan fazla mutasyon çeşidi tanımlanmış olup bölgesel farklılık göstermektedir (6,8,12-14).

2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri

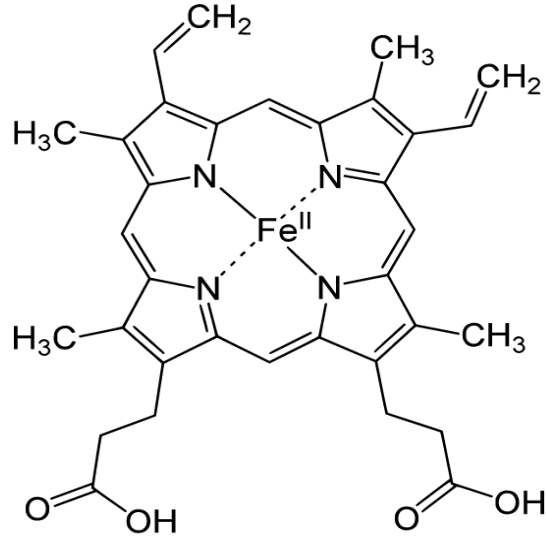
Hemoglobin (Hb), oksijeni (O_2) akciğerden dokulara, karbondioksiti (CO_2) dokulardan akciğerlere taşınmasını sağlayan bir protein olup en yüksek oranda eritrositlerde bulunur (15,16). Hb, globin ve hemden oluşan 64.400 dalton ağırlığında tetramer yapıda olup iki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri (α -benzeri, β -benzeri) ve dört molekül hemden oluşur (17,18). Hemoglobin molekülünde bulunan hem halkası bütün hemoglobinlerde aynıdır ve globin zincirinin kendi üzerine katlanması sonucu non-polar aminoasitler tarafından meydana getirilen Hem cepleri içerisinde yerleşmiştir. Bundan dolayı Hem'in yerleştiği ortam, hidrofobik bir ortamdır. Buna karşılık globin zincirleri; aminoasitler sayıları ve cinsleri farklılık göstermektedir (16,19). Aminoasitlerin sıralanması birincil yapıyı, aminoasitlerin aralarında hidrojen bağlarıyla heliksler biçiminde düzenlenmesi ikincil yapıyı, polipeptid zincirlerin

katlanarak üç boyutlu bir forma ulaşmasıyla üçüncül yapıyı ve dört polipeptid zincirinin birleşerek oluşturduğu tek bir molekül ise dördüncül yapıyı oluşturur (Şekil 1) (17).



Şekil 1. Hemoglobin yapısı (20).

Hem, bir protoporfirin IX ve iki değerlikli demir (Fe⁺²) kompleksidir. Merkezinde Fe⁺² atomu olan Meten köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelir (Şekil 2). Hem içindeki demir atomları O₂'i bağlayarak taşınmasını sağlar (15,16).



Şekil 2. Hem'in yapısı (21).

Değişik hemoglobinler için globin zincirleri farklıdır ve bu farklılıklar ; α , β , γ , δ , ϵ ve ζ (zeta) olarak ifade edilir. Hb' lerin tümü, her bir globin zincirine bir hemin bağlandığı farklı ikişer çift globin zincirinden oluşan, bir tetramerik yapıya sahiptir (17,22). 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 ($\alpha_2\epsilon_2$) yapısından oluşur (Tablo 1) (17,23). 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 (22). Gelişimin farklı evrelerinde, farklı tipte hemoglobinler yapılmaktadır (Tablo 1) (1).

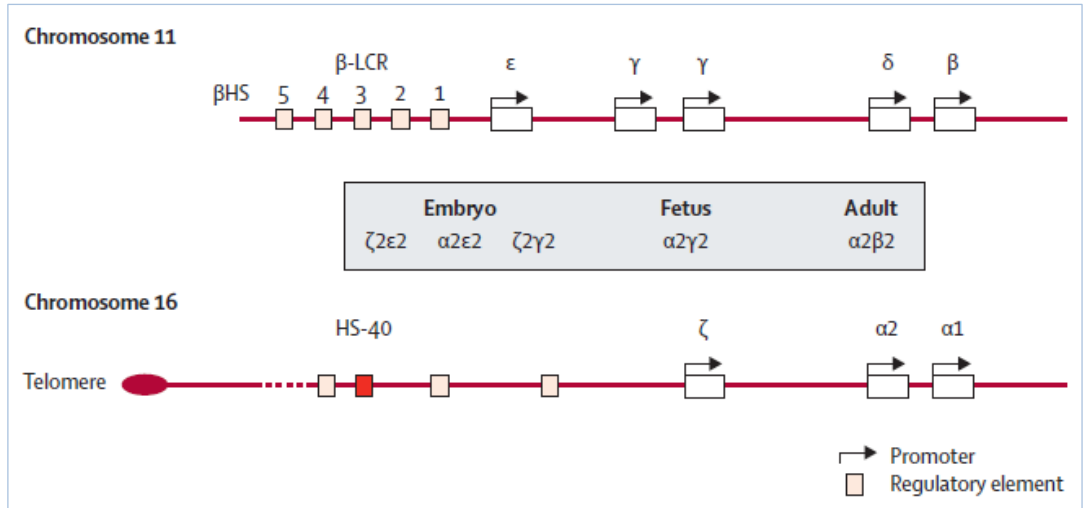
Tablo 1. Hemoglobin fenotipleri.

Hemoglobinin Adı	Yapısı	Dönem
Hemoglobin Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin Gower 1	$\zeta_2\epsilon_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin F	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal Dönem
Hemoglobin A2	$\alpha_2\delta_2$	Erişkin hemoglobini
Hemoglobin A	$\alpha_2\beta_2$	Erişkin hemoglobini

ekspresiyonunda bir takım kritik dizilere sahiptir. Transkripsiyon başlangıcının göstergesi CAP bölgesi, ATG başlangıç kodonu, verici ve alıcı splice bölgeleri (mRNA işlenmesi sürecine katılıyor), sonlandırma kodonu ve poly(A) adenilasyon. Esasen globin gen ekspresiyon süreci aşağıdaki adımlardan oluşur: Primer mRNA transkripsiyonunu içine alan DNA transkripsiyonu; matür mRNA üretimi için intronların kaldırılması ve ekson birleştirilmesi ile birlikte hem 5' capping hem de 3' polyadenilasyon modifikasyonları içeren primer mRNA' nın işlenmesi ve protein sentezi için son şablon mRNA' nın translasyonu. Translasyon sitoplazmada oluşurken transkripsiyon ve RNA işlenmesi çekirdekte meydana gelir (1,22).

2.2.1. Globin gen kümeleri

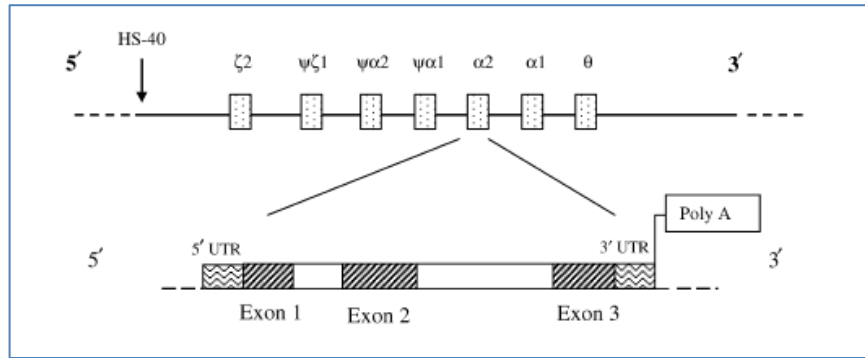
Hb oluşturan α ve β zincirlerinin genetik kontrolü iki ayrı gen kümesi tarafından yapılır. α gen ailesi 16. kromozomun kısa kolunda yer alır ve gen kümesinde ζ ve $\alpha 1$, $\alpha 2$ genlerini içerir (Şekil 4). β -globin gen ailesi ise 11. kromozomun kısa kolunda yer alır ve gen kümesinde 5'→3' ucuna doğru ϵ , γ^G , γ^A , δ ve β - globin genlerini içerir (Şekil 4) (1,2,22,26).



Şekil 4. α ve β -globin gen ailesi yapısını gösterir (25).

2.2.1.1. α -globin gen kümesi

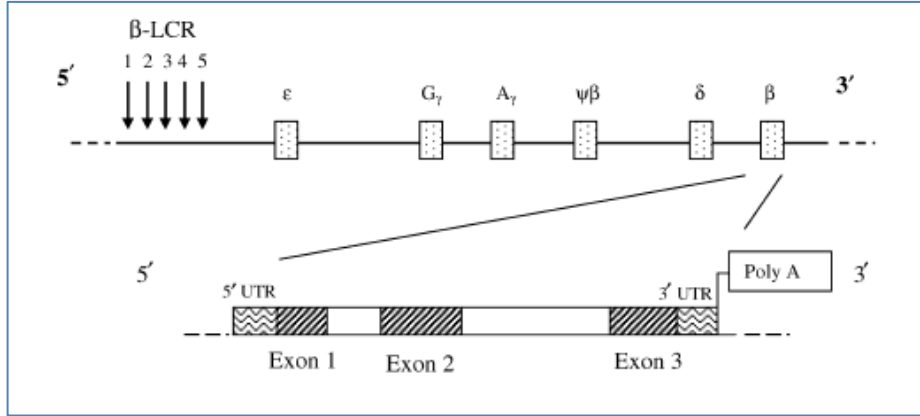
Alfa globin gen ailesi 16. kromozomun kısa kolu (16p13.3) üzerinde, yaklaşık 80 kb bir bölgeyi kapsamakta olup, 141 aa tarafından kodlanmaktadır. Sırasıyla 5'- ζ 2- ψ ζ 1- $\psi\alpha$ 2- $\psi\alpha$ 1- α 2- α 1- θ -3' genlerini (Şekil 5) içerir. α gen kümesi, üçü (ζ , α 1 , α 2) fonksiyonel ve dördü ($\psi\zeta$, $\psi\alpha$ 1, $\psi\alpha$ 2 ve θ 1) fonksiyonları bilinmeyen toplam yedi gen içermektedir (1,26–29).



Şekil 5. α -globin gen ailesi (26).

2.2.1.2. β -globin gen kümesi

β -globin gen ailesi 11. kromozomun kısa kolu (11p15.5) üzerinde bulunur ve yaklaşık 70 kb'lık yer tutmaktadır. Genomik dizi 5 fonksiyonel β -benzeri globin geninden oluşur ve 5'→3' ucuna doğru ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, $\psi\beta$, δ ve β şeklinde sıralanmıştır (Şekil 6) (1,2). β -globin gen kümesi β -LCR (Beta-locus control region) kontrolü altındadır. β -LCR yaklaşık 20kb uzunluğunda, ϵ geninin 6-18kb önünde yer alır. LCR'de transkripsiyonel düzenlemeyi yapan 5 farklı HS (hypersensitive site) dizisi bulunmaktadır. Bu diziler HS1, HS2, HS3, HS4 ve HS5'ten oluşmakta ve bu dizilerden her biri, transkripsiyonu aktifleştirmede ya da baskılamada görev almaktadırlar (2,30). β -globin gen kümesi yaklaşık 1600 bp uzunluğunda ve 146 aa tarafından kodlanmaktadır. Genomik dizide ekson-I ilk 30 aa'i, ekson-II 74 aa'i (31- 104) ve ekson-III ise 42 aa 'i (105-146) kodlamaktadır (2). Bu genler 3 ekzon, 2 intron ve 2 UTR (5', 3') bölgesi içerir. Ekzonlar kodlamaya katılırken, intronların kodlamaya katılmadığı düşünülmektedir (7).



Şekil 6. β -globin gen ailesi (26).

2.3. Talasemiler

Talasemiler bir ya da daha fazla globin zincirinin (β , γ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$, δ ve $\epsilon\gamma\delta\beta$) yapım azlığı veya hiç yapılmamasıyla karakterize bir grup hematolojik hastalıklardır (2,27). Talasemi otozomal resesif geçiş gösteren heterozigot formda taşıyıcılığa, homozigot formda hastalığa yol açan kronik hemolitik bir anemidir. α zincir sentezinin yokluğu ya da eksikliği α -talasemi, β zincir sentezinin yokluğu ya da eksikliği β -talasemi olarak adlandırılır (7,31).

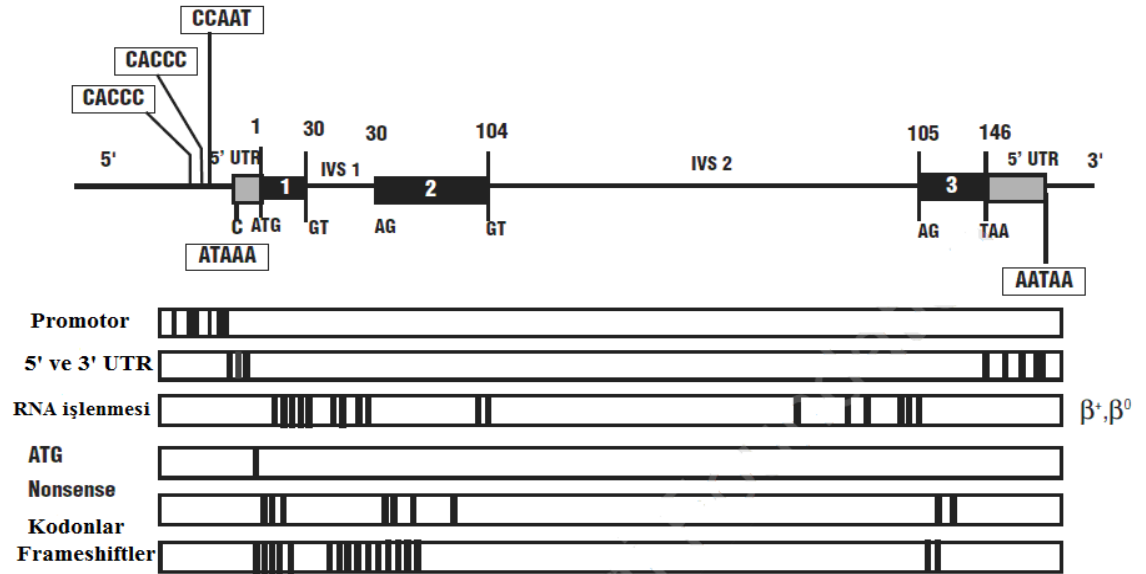
2.3.1. β -Talasemi

BT, hipokrom-mikrositer, hemolitik anemi ile karakterize ve yaşamın sürdürülebilirliğinin kan transfüzyonuna bağımlı olduğu otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır. 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5) yer alan, β -globin geninde meydana gelen mutasyon sonucunda β -globin zincir yapımının azalması veya yokluğu ile karakterizedir (1–3).

β -globin sentezinin azalması β^+ -talasemi, yokluğu ise β^0 talasemi olarak adlandırılır (1,11,32). BT'ye yol açan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiş olup hastalığın en önemli nedeni gen içindeki nokta mutasyonları ve daha az oranda da delesyon mutasyonlarıdır. PCR ve direkt DNA dizi analizi yöntemlerinin rutin kullanıma girmesi ile β -globin geninde mutasyonların sayısında hızla bir artış görülmüş ve 200'den fazla çeşit mutasyon tespit edilmiştir (6,14).

2.3.2. β -Talasemiye neden olan mutasyonlar

BT, moleküler düzeyde oldukça heterojendir. Mutasyonların büyük bir kısmını tek nükleotid değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan delesyonlar ya da insersiyonlar neden olduğu non-delesyonel mutasyonlar oluşturmaktadır. BT mutasyonları nadiren büyük gen delesyon kaynaklıdır. β -globin genindeki mutasyonlar gen ekspresyonundaki çeşitli kademeleri etkileyerek β -globin zincir sentezinin bozulmasına neden olurlar (Şekil 7). Mutasyonlar genellikle coğrafik ve etnik bir dağılım göstermektedir (7,18). BT mutasyonlarının güncellenen tam listesine, Globin Gene Server Web Sitesi aracılığıyla ulaşılabilir (<http://www.globin.cse.psu.edu>).



Şekil 7. BT'ye neden olan nokta mutasyonlarının sınıflandırılmaları. Üç ekzon ve iki intronda oluşan β -globin geninin genel yapısı ve gendeki korunmuş diziler (2).

2.3.2.1. Non-delesyonel mutasyonlu β -talasemi

BT ile sonuçlanan nokta mutasyonlar; çeşitli mekanizmalar ile β -gen ekspresyonunu etkileyebilen tek baz değişimi ya da oligonükleotid insersiyon / delesyon ile oluşmaktadır (Tablo 2). Bu mutasyonlar üç ana kategoride sınıflandırılabilir:

A. β -gen transkripsiyonu değiştiren mutasyonlar (Promotör ve 5' UTR).

B. mRNA işlenmesini (processing) etkileyen mutasyonlar (splice bölgesi ve consensus dizi mutasyonları, ekson ve intronların gizli bölge mutasyonları ve polyadenilasyon bölgesi ve diğer 3' UTR mutasyonları).

C. Anormal mRNA translasyon ile sonuçlanan mutasyonlar (anlamsız = nonsense, çerçeve kayması = frameshift ve başlangıç kodonu mutasyonları) (1).

Tablo 2. Beta talasemiye neden olan mutasyonların sayısı ve çeşitleri (1).

Beta Talasemiye Neden Olan Mutasyonlar		
	FENOTİP	MUTASYON SAYISI
Transkripsiyonel Mutasyonlar		
Promoter	Sessiz	2
	Hafif	5
	B ⁺	12
5'-UTR	Sessiz	4
	Hafif	1
	B ⁺	1
RNA İşlenmesi		
Splice kavşağı	B ⁰	24
Consensus splice bölgeleri	Sessiz	1
	B ⁰	1
	Hafif	1
	B ⁺	8
İntronlardaki gizli splice bölgeleri	B ⁰ /B ⁺	1
	B ⁰	1
	B ⁺	3
Eksonlardaki gizli splice bölgeleri	Hafif	2
	B ⁺	3
Poliadenilasyon Sinyali	Hafif	4
	B ⁺	2
Diğerleri	Sessiz	1
	Hafif	1
	B ⁺	1
RNA Translasyonu		
Başlangıç kodonu	B ⁰	7
Anlamsız kodon	B ⁰	14
Çerçeve kayması	B ⁰	64
Delesyonlar	B ⁰	17
Dominant β-Talasemiler		
Yanlış anlamlı mutasyonlar	B ⁰	8
Delesyon veya insersiyon	B ⁰	7
Anlamsız mutasyonlar	B ⁰	2
Çerçeve kayması veya anormal splicing	B ⁰	14
TOPLAM		214

A. Transkripsiyon mutasyonları

1. Promoter mutasyonları

β -globin geninin 5' yan tarafında, dizisi korunmuş motifler içinde (TATA kutusu, proksimal ve distal CACCC kutusu) veya çevresinde tanımlanmış olan mutasyonlardır. RNA polimeraz bağlamasının bozulması sonucu mRNA transkripsiyonunda normaline göre % 20-30 oranında azalma meydana gelir. Sonuçta orta derecede β -globin zinciri kaybına bağlı olarak hafif fenotipte β^+ -talasemi kliniği görülür (1).

2. 5' UTR mutasyonları

Bu bölgede tek baz değişimi ve minör delesyonlar gibi çeşitli mutasyonlar bildirilmiştir. Heterozigot durumunda normal veya sınırda eritrosit indeksleri ve HbA2 görülür iken; ağır BT allelli birleşik heterozigotta genellikle hafif fenotipte β^+ -talasemi görülür. mRNA başlık bölgesinde (Cap + 1 A->C) meydana gelen mutasyonda; transkripsiyonda azalma, başlıklanmada yavaşlama ve mRNA kararlılığında bozulma meydana gelir. Sadece homozigot durumda talasemi taşıyıcılığı hematolojik değerlerini gösterir (1,33).

B. RNA işlenmesini etkileyen mutasyonlar

Esas olarak RNA işlenmesi; fonksiyonel mRNA üretmek için intronların çıkarılması ve kodlama bölgelerinin birleştirilmesinden oluşmaktadır. Bu sürecin hassaslığı, mevcut intron / ekson sınırlarının hassas dizilerine dayanır. Bu diziler birleşme bölgelerindeki oldukça iyi korunmuş değişmez dinükleotidler olan 5' bölgesindeki GT ve 3' bölgesindeki AG ve konsensüs dizileridir (flanking dizileri) (1).

1. Splice bölgesi ve consensus dizi mutasyonları

Değişmez dinükleotid (5'-GT ve 3'-AG) mutasyonları normal splicing ortadan kaldırır ve β^0 -talasemiye neden olur. Şimdiye kadar değişmeyen

dinükleotidleri içeren 24 mutasyon tespit edilmiştir. mRNA' daki diğer gizli splice bölgeler, alternatif splice için kullanılır ancak mis-spliced (hatalı yerleşimli) mRNA ile fonksiyonel β -globini üretilemez. Normal splicing etkinliği, splice bölgesinin hemen bitişiğindeki konsensüs dizilerinde meydana gelecek mutasyonlarla azaltılabilir. β -globin üretiminde azalma oldukça değişkendir ve hafif / şiddetli fenotiple sonuçlanır. Örneğin; IVS-1-5 (G→C, G→T, G→A) mutasyonunda β -globin sentezinde belirgin bir azalma oluşturduğundan ağır β^+ -talasemi fenotipine neden olur. Halbuki Akdeniz bölgesinde oldukça yaygın olan IVS-1-6 (T→C) mutasyonu, splicing etkinliği hafif etkiler ve hafif β^+ -talasemi klinik tablosu görülür (1).

2. İntron ve ekzonlardaki gizli bölge mutasyonları

İntronlar ve ekzonlar boyunca, intron-ekson sınırlarında benzer diziler vardır. Normalde “ gizli splice bölgeler ” splicing için kullanılmazlar. Bu dizileri içeren nükleotid değişimlerinin bir kısmı normal alanda gizli bir bölgeye dönüşür. Bu yeni splice sinyali, splice için normal konsensüs sekansı ile yarışır ve bazı durumlarda, şiddetli β^+ veya β^0 talasemi fenotipi ile sonuçlanır. IVS-1' de iki ve IVS-2' de dört gizli splice bölge mutasyonları tanımlanmıştır. Ekzonlarda bulunan üç gizli splice bölgeler nükleotid değişimiyle aktive olabilir: Birincisi, kodon 10 (C→A), ikincisi, kodon 19 (A→G) ve üçüncüsü, kodon 24 (T→A), 26 (G→A) veya 27 (G→T)' deki mutasyonlar tarafından oluşur. Nükleotid değişimleri, kısmen gizli splice bölgeleri aktive ederek, hem normal hem de anormal spliced β -mRNA ile sonuçlanırlar. Kodon 24 (T→A) mutasyonu dönüşümü sessizdir ve şiddetli β^+ -talasemi ile ilişkilidir. Kodon 19 (Hb Malay), 26 (HbE), ve 27 (Hb Knossos) mutasyonları anormal hemoglobin üretimine neden olur ve normal splice bölgelerinin kullanımından dolayı hafif veya sessiz bir fenotipi ile ilişkilidir (1).

3. Poly (A) ve diğer 3' UTR mutasyonları

Polyadenilasyon, mRNA stabilitesini belirlemede önemli olduğundan 3' UTR'deki AATAAA sekansını etkileyen mutasyonlar, translasyon etkinliğini etkiler ve hafif şiddette β^+ -talasemiye neden olurlar. Şimdiye kadar 8 çeşit mutasyon

tanımlanmıştır. Diğer 3 'UTR bölgesindeki (+1480 C→G) mutasyonlarda ise sessiz β^+ talasemi kliniği görülür (1,6).

C. RNA translasyonunu etkileyen mutasyonlar

Mutasyonların pek çoğu mRNA translasyonunun çeşitli adımlarını değiştirebilir. mRNA translasyonunu etkileyen mutasyonlar üç kategoride sınıflandırılabilir: 1. Başlangıç kodonu mutasyonları, 2. Anlamsız mutasyonlar, 3. Çerçeve kayması mutasyonlarıdır (1).

1. Başlangıç kodon mutasyonları

Başlangıç kodonu olan ATG (metionin aa'ini. kodlar), translasyon başlangıcı için önemli bir uyarıdır. Şimdiye kadar başlangıç kodonunda 7 farklı nokta mutasyon rapor edilmiştir. β^0 -talasemi kliniğine neden olmaktadır (1).

2. Anlamsız mutasyonlar

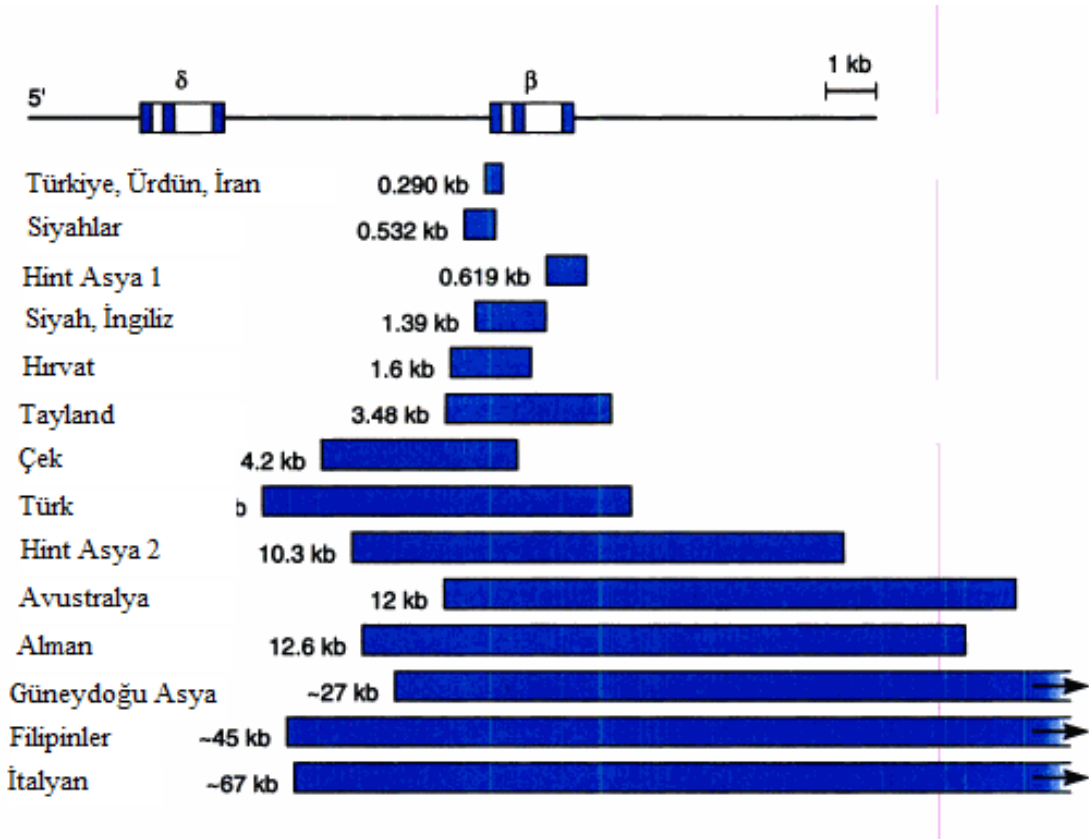
Bir aa kodonunu, sonlandırma kodonuna çeviren tek baz değişimi (Stop kodon: TAA, TAG veya TGA) sonucu mRNA'nın translasyonu durur. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi olmaz ve bu durum β^0 -talasemi ile sonuçlanır (1,33).

3. Çerçeve kayması mutasyonları

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru oluşan nükleotid kayması ile ($5' \rightarrow 3'$ veya $3' \rightarrow 5'$ yönünde) mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek farklı aa'lerin şifreleri ortaya çıkmaktadır. Farklı aa dizilimli ve normalden kısa olarak oluşan mRNA' lar normal globin zincirini sentezleyemeyecek ve β^0 -talasemi kliniği ortaya çıkacaktır (1,34).

2.3.2.2. β -globin gen delesyonları

β -globin genini etkileyen gen delesyon mutasyonları, α -talasemilerin aksine çok nadirdir. β -globin genini etkileyen, büyüklüğü 290- 67000 bp arasında değişen çeşitli gen delesyonları bildirilmiştir. Şimdiye kadar 17 tane gen delesyonu tanımlanmıştır (8'i küçük, 9'u büyük delesyonlar) (Tablo 2), (Şekil 8). Hindistan ve Pakistan popülasyonlarında yüksek frekansta görülen 3' ucundaki 619 bp'lik delesyon hariç β -globin genindeki delesyonlar nadir olarak görülmektedir. Heterozigotlarda HbA2 ve HbF düzeyinde olağan dışı yükseklik vardır. β^0 -talasemi fenotipinde bir klinik tablo oluşmaktadır (1,6,32).

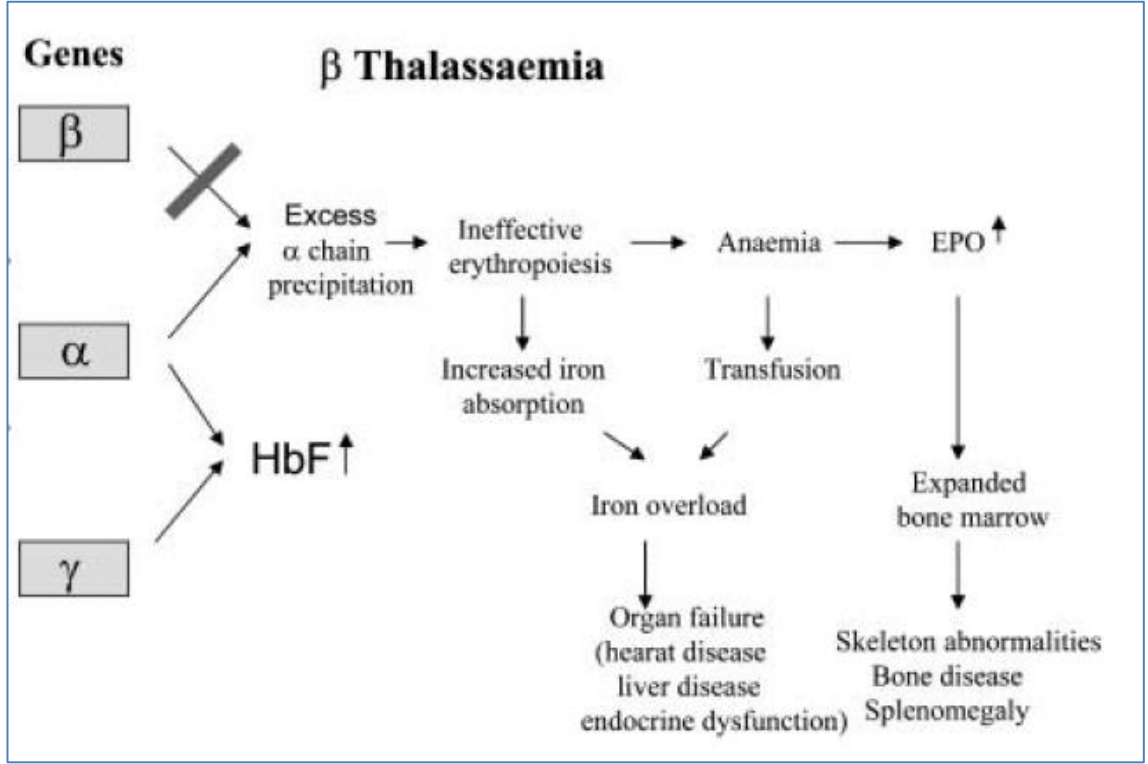


Şekil 8. β -globin gen ve komşu DNA dizisinin β^0 -talasemi ile ilişkili delesyonları (35).

2.3.3. β -Talasemilerde patofizyoloji

Gelişimin her evresinde α ve β benzeri globinlerin üretilmesi bir denge halindedir. β -globin genindeki mutasyonlar, β zincirinin hiç yapılmamasına veya

yeteri kadar yapılamamasına neden olmaktadır. Bu durumda α zincir yapımı normal hızda devam ettiği için α zincir lehine bir zincir dengesizliği meydana gelir (Şekil 9) (2,3,25).



Şekil 9. BT patofizyolojisi (10).

BT' de klinik bulgu ve semptomların çoğunluğunun sebebi Hb sentezinde kullanılmayan α zincirlerinin büyük intrasellüler inklüzyonlar oluşturarak eritroid serinin kemik iliğinde olgunlaşmakta olan genç hücrelerinde çökmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu hücrelerin bir kısmı kemik iliğinde olgunlaşmadan parçalanır (ineffektif eritropoiez). Dolaşıma geçen α zincir inklüzyonlarını içeren olgunlaşmış eritrositer seri hücreleri yaşam sürelerini tamamlamadan, özellikle dalağın mikrosirkülasyonundan geçerken harap olur. Buna bağlı olarak ortaya çıkan anemi, böbreklerden eritropoietin yapımının artışı için bir uyarıdır (2,3,10).

BTM' li hastalarda Hb' nin büyük bir kısmını HbF oluşturmaktadır ve oksijene ilgisi fazla olduğundan dolayı doku anoksisine katkıda bulunarak eritropoietin artışına neden olmaktadır. Artan eritropoietin, kemik iliği aktivitesinde

artışa neden olur ve buna bağlı olarak kafatası ve ekstremitelerde kemiklerinde masif bir genişleme ile ilgili olarak ciddi deformiteler oluşur. Anormal eritrositler seri hücreleri dalak tarafından dolaşımdan kaldırıldığı için dalak hipertrofiye uğrar. Sonuçta gelişen splenomegali anemiye katkısı olan plazma volümünün artışına ve hipersplenizme neden olur (3,10,36).

γ -globin zincir sentezi doğumdan sonra farklı ölçüde devam etse de α zincirleri ürünleriyle eşleşecek kadar yeterli olmamaktadır. γ zincirleri HbF'i oluşturmak için α zincirleriyle kombine olduklarından dolayı BT' lilerin kemik iliğinde rölatif olarak fazla γ zincir yapan hücreler α zincir presipitasyonunun zararlı etkisine karşı kısmen korunmuş olur. Bu hücreler selektif yaşama avantajına sahip oldukları için periferik kanda da bulunurlar. Bu sebepten dolayı yüksek HbF seviyesi ve HbA₂'deki artış BT' nin karakteristik bulgularını oluşturur (3,10).

2.3.4. β -Talasemilerde fenotipler ve klinik formlar

BT' de temel kusur β -globin zincirlerinin azlığı veya yokluğuna bağlı α -zincirlerinin göreceli artışına bağlıdır. BT' de klinik tablo şiddeti zincir dengesizliğinin şiddetine bağlıdır. β -globinin üretilmediği durumda β^0 -talasemiler, β -globinin üretimi var ama normalden az üretildiği durumda β^+ -talasemi olarak adlandırılırlar. BT' de klinik olarak: β -talasemi minör (BTT, β -talasemi taşıyıcılığı, heterozigot β -talasemi), β -talasemi intermedia (BTI), β -talasemi majör (BTM, Cooley's Anemia, Akdeniz anemisi) olmak üzere 3 ana formu vardır (1,25,37).

Çoğu talasemi otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır. Nadir dominant formlarından ayrı olarak BTM ve BTI' lı kişiler, β^0 veya β^+ genleri açısından homozigot veya birleşik heterozigot iken, BTT' li kişiler ise çoğu zaman heterozigottur. BTM' li bireyler genellikle hayatlarının ilk 2 yılında tıbbi bakım gerektiren ve tedavi için düzenli eritrosit transfüzyonuna ihtiyaç duyan hastalardır. BTI' lı hastalarda ise klinik bulgular hayatlarının ileriki dönemlerinde ortaya çıkmakta ve düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duymamaktadırlar (3).

2.3.3.1. β -Talasemi minör

BTT' li kişiler genellikle asemptomatiktir. Tanısı genellikle pozitif aile öyküsü veya popülasyon tarama sırasında konulur. Anemi hafif ya da yoktur. Gebelikte anemi, normal kadınlara göre daha şiddetli olabilir (1). Fe^{+2} emilimi artmış ve aşırı demir birikimi bildirilmiştir (38). Ortalama Hb konsantrasyonu; İtalyan erkek ve kadınlarda sırasıyla 12.7 ve 10.9 g/dL; Yunan erkeklerinde 13.9 g/dL ve Doğu' da erkekler ve kadınlarda sırasıyla 12.1 ve 10.8 g/dL düzeyinde görülür (1). RBC (Eritrosit) artmış, MCV (Ortalama eritrosit hacmi) ve MCH (Ortalama eritrosit hemoglobini) düzeyleri azalmış. MCHC (Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu) normal ya da azalmıştır. Periferik kan yaymasında yaygın olarak hipokrom, mikrositoz ve eritrositlerin boyutu ve şeklinde belirgin farklılıklar ortaya çıkar. BTT' lilerde Hb pattern; HbA % 92-95, HbA2 > % 3.8 ve değişken miktarı ile HbF % 0,5-4 dolayında görülür (1,7,38).

2.3.3.2. β -Talasemi intermedia

BTI' lı hastalar klinik tablo açısından belirgin heterojenite göstermektedir. Temel belirtileri; solukluk, sarılık, safra taşı, hepatosplenomegali, orta şiddette iskelet değişiklikleri, bacak ülserleri, ekstremitelerde dokuda hiperplastik eritroid kemik iliği, osteopeni ve osteoporoz gelişme eğilimi ve özellikle splenektomili hastada anormal eritrositlerin lipid membranından kaynaklanan hiperkoagülobiliteminin neden olduğu trombotik komplikasyonlardır (7,39). Genellikle transfüzyon gereksinimi olmamakla birlikte nadirde olsa gerekebilir. İneffektif eritropoezden kaynaklanan intestinal demir emilimi artması nedeniyle aşırı demir yüklenmesi meydana gelir. Zamanla aşırı demir yüklenmesine bağlı olarak komplikasyonlar ortaya çıkabilir, fakat komplikasyonlar daha çok tranfüzyona bağımlı olan hastalarda görülür. BTI, BTM ve BTT arası klinik ve hematolojik tablo göstermektedir. Hematolojik tablo açısından belirgin heterojenite görülür ve orta şiddette anemi vardır (7).

2.3.3.3. β -Talasemi majör

BTM kliniği genellikle 6-24 ay arasında oluşur. Etkilenen infantlarda gelişme geriliği ve giderek artan solukluk; daha sonra beslenme problemleri, ishal, sinirlilik, tekrarlayan ateş atakları, ilerleyici dalak ve karaciğer büyümesine bağlı karın bölgesinde genişleme meydana gelebilir. BTM' de klinik tablo; gelişme geriliği, solukluk, sarılık, kas güçsüzlüğü, genu valgum, hepatosplenomegali, bacak ülserleri, ekstramedüller hematopoez ve kemik iliğinin genişlemesinden kaynaklanan iskelet değişiklikleri ile karakterizedir. İskelet değişiklikleri; bacaklarda, uzun kemiklerde deformiteler ve tipik kraniofasial değişiklikler içermektedir. Hb konsantrasyonunu 9.5-10.5 g/dL olarak sağlayan düzenli transfüzyon programı ile büyüme ve gelişme 10-12 yıl kadar normal eğiliminde seyreder. Transfüze edilen hastalarda aşırı demir yüklenmesine bağlı olarak komplikasyonlar gelişebilir. Çocuklarda büyüme-gelişme geriliği ya da cinsel olgunlaşmada gecikme komplikasyonları oluşur. Aşırı demir yüklenmesine bağlı; kalp (dilate myokardiyopati veya nadiren aritmi), karaciğer (fibrozis ve siroz) ve endokrin bezlerle (diyabet mellitus, hipogonadizm ve paratiroid, tiroid, hipofiz, daha az sıklıkla adrenal bezlerin yetersizliği) ilişkili komplikasyonlar gelişir (3). Diğer komplikasyonlar, hipersplenizm, kronik hepatit (hepatit B ve/veya C), HIV enfeksiyonu, venöz tromboz ve osteoporozdur. Hepatosellüler karsinom riski; karaciğer viral enfeksiyon ve aşırı demir yüklü hastalarda artmıştır (40). Düzenli transfüzyon yapılmayanlar genellikle ikinci-üçüncü dekattan önce ölmektedirler. Düzenli transfüzyon ve uygun şelasyon ile tedavi edilmiş hastaların hayatta kalma süresi 40 yaş ve ötesine uzayabilmektedir. BTM' li hastaların çoğu kardiyak komplikasyonlar nedeniyle ölmektedirler (41).

BTM' li hastalarda RBC artışı, MCV ve MCH düşüklüğüyle ilişkili şiddetli hipokrom, mikrositer anemi görülür. Periferik kan yaymasında; hipokrom ve mikrositoz, anizositoz, poikilositoz ve nükleotidli eritrositler (örn., eritroblastlar) görülür. Eritroblastların sayısı aneminin derecesi ile ilgilidir ve splenektomi sonrası belirgin artar. Hb varyantları BT türüne göre değişir. β^0 -talasemide; HbA yoktur, HbF % 95-98 ve HbA2 % 2-5 düzeyinde görülür. β^+ -talasemi homozigot veya β^0/β^+ bileşik heterozigotlarda Hb varyant; HbA: %10-30, HbF: %70-90 ve HbA2: %2-5 düzeyinde görülür. Kemik iliği incelenmesi, etkilenen bireylerin teşhisi için

genellikle gerekli değildir. Fakat kemik iliği eritroid hiperplazi açısından son derece hücrelidir (7).

2.3.5. β -Talasemi tanısı

2.3.5.1. Klinik tanı

BTM’ de genellikle şiddetli mikrositik anemi, hafif sarılık ve hepatosplenomegalisi olan iki yaştan küçük bebekler kliniği oluşturmaktadır. BTI’ da benzer ancak daha hafif klinik bulgular ile daha geç yaşlarda kliniği oluşmaktadır. Taşıyıcılar genellikle asemptomatiktir, fakat bazen hafif anemik olabilir (3).

2.3.5.2. Hematolojik tanı

RBC indeksi mikrositer anemi göstermektedir. BTM’ de Hb: <7 g/dL, MCV: 50-70 fL, MCH: 12-20 pg düşüklüğü ile karakterizedir. BTI’ da Hb: 7-10 g/dL, MCV: 50-80 fL, MCH: 16-24 pg seviyesi ile karakterizedir. BTT’ de artan HbA2 düzeyi ile MCV ve MCH düşüklüğü ile karakterizedir (3,42).

2.3.5.3. Periferik kan yayması

Etkilenen bireylerde, eritrositte morfolojik değişiklikler (mikrositoz, hipokrom, anizositoz, poikilositoz) ve nükleotidli eritrositler (örn. Eritroblastlar) görülmektedir. Eritroblastların sayısı anemi derecesi ile ilişkili olup ve splenektomi sonrası önemli ölçüde artar. Taşıyıcılarda, etkilenen bireylerden daha az şiddetli olarak eritrositte morfolojik değişiklikler görülmektedir. Taşıyıcılarda, normalde eritroblastlar görülmezler (3).

2.3.5.4. Elektroforez veya HPLC

BT' de Hb varyant, BT' nin türüne göre değişir. β^0 -talasemi homozigotta; HbA yok iken, HbF: % 92-95'i oranında görülür. β^+ -talasemi homozigot ve β^+/β^0 birleşik heterozigotta; HbA: %10-30 ve HbF: % 70-90 düzeyinde görülür. HbA2 düzeyi BT homozigotlarda değişkendir ve BTT' yi geliştirmektedir (3).

2.3.5.5. Moleküler genetik analiz

Her popülasyonda sınırlı sayıda mutasyonların sıklığı büyük ölçüde moleküler genetik testi kolaylaştırmıştır. β -globin geninde görülen mutasyonlar sıklıkla PCR tabanlı prosedürlerle tespit edilir (43). Etkilenen toplumda, en yaygın olarak kullanılan yöntemler; prob seti veya primerler kümesi ile reverse dot blot analizi veya primer-spesifik amplifikasyondur. Eğer bu yöntemlerle mutasyon tespit edilemiyorsa; β -globin gen dizi analizi kullanılabilir (3).

2.3.6. Prognoz

BTT' li olan kişilerde normal bir yaşam beklentisi vardır. BTM' li kişilerde ortalama yaşam süresi 17 yıl ve genellikle 30 yaşından önce ölürlür. En sık ölüm nedeni aşırı demir yüküne bağlı kardiyak komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır (3,27).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Gereçler

- Tam Kan Sayım Cihazı (Cell-Dyn 3700, Abbott diagnostics, IL, USA)
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC Agilent 1100 serisi, Germany)
- Mikrosantrifüj (M-240R, Boeco, Germany)
- Santrifüj (NF 048, Nüve, Türkiye)
- Isı bloğu (Bio TDB-100, Boeco, Germany)
- Vorteks (Vortex V 1 Plus, Boeco, Germany)
- Spektrofotometre (UV-1208, Shimadzu, Japan)
- PCR Cihazı (Thermal cycler, Applied Biosystems, USA)
- Elektroforez ünitesi (Bio-Rad, PowerPac 300, USA)
- Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad, Mini Transilluminator, Canada)
- DNA Dizi Analizi Cihazı (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)
- Otomatik pipetler (Boeco, Germany)
- Laminer Hava Akış Sistemleri (Telstar® BIO II A, Telstar Technologies, Spain)
- Tartı (Sartorius Basic; Sartorius AG, Goettingen, Germany)

3.1.2. Kimyasal maddeler

- Eritrosit Lizis Tamponu (Gordion Diagnostik, Ankara, Türkiye)
- Buffer A hemoglobin varyants (Gordion Diagnostik, Ankara, Türkiye)
- Buffer B hemoglobin varyants (Gordion Diagnostik, Ankara, Türkiye)
- Lizis Tamponu (Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Proteinase K (Macherey-Nagel, Duren, Germany)

- Etanol (Merck)
- Wash buffer (WB, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Wash buffer (B5, Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- Elition buffer (Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- GML PCR Mix (GML, Switzerland)
- GML Taq. Polimeraz (GML, Switzerland)
- Primerler (GML, Switzerland)
- G/C Enhancer (GML, Switzerland)
- Agaroz (Sigma)
- 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)
- Etidium Bromide (Amresco, USA)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas)
- 6X Loading Dye solution (Fermentas)
- ExoSAP-IT (GML, Switzerland)
- Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA)
- Big Dye® Terminator v3.1 5X Sequencing buffer (Applied Biosystems, USA)
- Buffer 10X (Applied Biosystems, USA)
- POP-6™ polimer (Applied Biosystems, USA)
- Sephadeks (Sigma)

3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Hematoloji Bölümünde tedavisi ve/veya takibi yapılan, BTM tanısı almış hastalar ve ebeveynleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan bireyler arasında yaş ve cinsiyet ayırımı yapılmadı. 30 BTM' li hasta ve 30 ebeveyn olmak üzere toplam 90 birey çalışmaya alındı. Hastadan kan tranfüzyonu yapılmadan önce tam kan örneği alındı. Çalışmaya dahil edilen hasta ve ebeveynin her birinden iki adet EDTA' lı tam kan tüplerine, her birine 2 mL olacak şekilde kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri soğuk zincir

kuralına uyularak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarına ulaştırıldı. Örneklerin kaydı ve barkodlama işlemi yapıldıktan sonra tam kan tüplerinden biri ile hematolojik parametreleri ve HPLC ile Hb varyant düzeyleri çalışıldı. Hematolojik parametreleri aynı günde çalışıldı. HPLC ile Hb varyant düzeyleri ise, +4⁰ C saklanan örneklerde çalışıldı. Diğer hemogram tüpü moleküler gen analizi için -20⁰ C' de saklandı. Daha sonra her seferinde 24 örnek soğuk zincir kuralları gözetilerek, Moleküler Tanı Laboratuvarımızda DNA izolasyonları yapıldı. İzolasyonu yapılan örnekler -20⁰ C' de saklandı. Moleküler gen analizi için DNA izolasyonu yapılmış örneklerde ikili-üçerli aileler (hasta-anne-baba) şeklinde PCR yardımı ile DNA ürünleri çoğaltıldı. Birkaç işlem basamağından sonra β-globin geninde, dizi analizi yöntemiyle mutasyonlar araştırıldı. Çalışmamızın yapılabilmesi için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul onayı alındı (Karar no: 739/ 13.11.2012).

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hemogram düzeyleri

EDTA' lı tüpe alınan kan örneğinden tam kan sayımları, Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) cihazında flow sitometri yöntemiyle çalışıldı (Şekil 10). Tam kan sayımı analizinde: RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW parametrelerine bakıldı.



Şekil 10. Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA)

3.3.2. Hb varyant düzeyleri

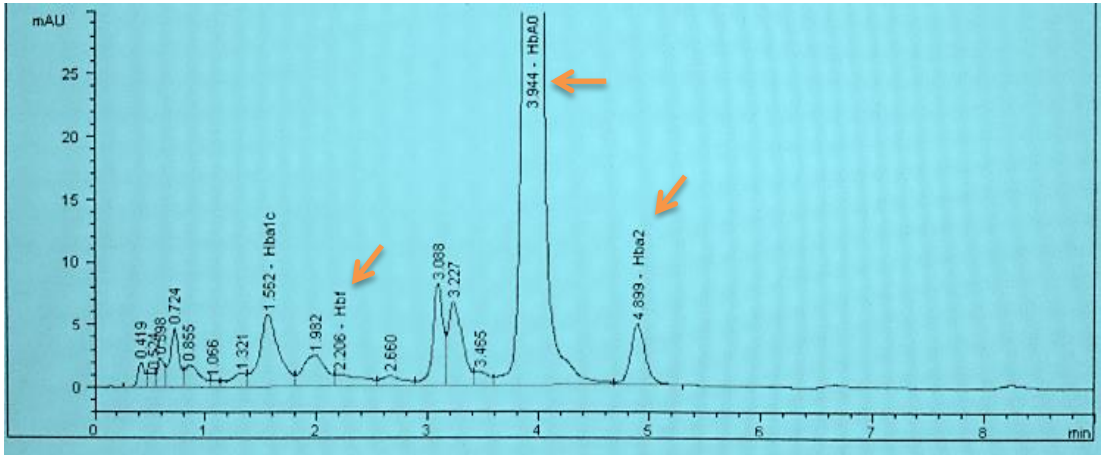
Hb varyantları olarak tanımlanan HbA, HbA₂, HbF düzeyleri, HPLC Agilent 1100 serisi (Agilent Technologies, Germany) cihazında çalışıldı (Şekil 11). Cihazın çalışma prensibi, hareketli fazın kolon içine yüksek basınçla pompalanarak sabit faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşimin tipine bağlı olarak ayrışması prensibine dayanmaktadır. Özel kolonlar, duyarlı saptayıcılar ve yüksek akış hızı ile üstün ayırma özelliğine sahiptir (44,45). Sabit faz için PolyCAT A™ 50×4.6 mm, 5µm, 1500Å kolon (PolLC inc.) kullanıldı. Hareketli fazda ise Buffer A ve Buffer B olmak üzere iki solüsyon kullanıldı. Cihazın gerekli kontrolleri yapıldıktan sonra Hb varyant analizi için Buffer A % 84 ve Buffer B % 16 akış hızı ile sabit kolonda basınç oluşturuldu. Hb varyant düzeyleri için, +4° C saklanan tam kan tüpleri oda şartlarında yaklaşık 30 dk bekletildi ve daha sonra 3-5 kez ters yüz edildi. Hb varyantı hesaplamak için aşağıdaki adımlar takip edildi.

- 2 mL viallere 500 µL hemolizat konuldu.
- Üzerine 5 µL tam kan örneği bırakıldı ve pipetaj yapıldı.
- Sırasıyla cihaza yüklenerek okutulmaya başlandı.



Şekil 11. HPLC Agilent 1100 serisi (Agilent Technologies, Germany)

Hb varyantlar düzeyleri, değerlendirmeyi yapan cihazda ayrılma süreleri ve konsantrasyonları okuyarak grafik haline çevirmektedir (Şekil 11). Her örnek için Hb varyantlarının kapsadığı alan yüzde olarak hesaplandı (Şekil 12).



Şekil 12. BTT' li bir hastaya ait Hb varyant grafiği.

3.3.3. Moleküler gen analizi

3.3.3.1. DNA izolasyonu

Dizi analizi için -20°C 'de saklanan tam kan örnekleri, önce $+4^{\circ}\text{C}$ ' de, sonra oda ısısında çözünmeye bırakıldı. Sonrasında örneklerin homojen dağılımı için 3-5 kez ters yüz edildi. DNA izolasyonu için 1.5 mL kapaklı ependorf tüpleri hazırlandı. β -globin geni mutasyon analizi için, ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı (Dr. Zeydanlı, Hayat bilimleri, Türkiye).

İzolasyon prosedürü:

1.5 mL kapaklı ependorf tüpüne

- 210 μL örnek + 210 μL Lysis solüsyonu + 25 μL proteinase K bırakıldı.
- İyice vortekslendi.
- Isı bloğunda 70°C ' de 15 dk inkübe edildi.
- Üzerine 210 μL etanol bırakıldı.
- İyice vortekslendi.
- Karışım 2 mL NucleoSpin kolona (Macherey-Nagel, Duren, Germany) bırakıldı.
- 11.000 rpm'de \rightarrow 1 dk mikrosantrifüj edildi (alt kısmı atıldı, üst kısmı temiz kolleksiyona bırakıldı).
- Üzerine 500 μL wash buffer BW eklendi.
- 11.000 rpm'de \rightarrow 1 dk mikrosantrifüj edildi (alt kısmı atıldı, üst kısmı temiz kolleksiyona bırakıldı).
- Üzerine 600 μL wash buffer B5 eklendi.
- 11.000 rpm'de \rightarrow 1 dk mikrosantrifüj edildi (alt kısmı atıldı, üst kısmı temiz kolleksiyona bırakıldı).
- Üzerine 150 μL elition buffer eklendi (çalışma sıcaklığı 70°C olmalıdır).
- 11.000 rpm'de \rightarrow 1 dk mikrosantrifüj edildi (üst kısmı atıldı, **alt kısmı izole edilmiş DNA'dır**).

İzole edilen DNA'nın spektrofotometrik yöntemle konsantrasyonu ve saflığını değerlendirmek için 1 mL hacimli kuartz küvet kullanıldı. Küvetlerden biri kör olarak seçildi ve 1000 μL bidistile su eklendi. İkinci tüpe ise 990 μL bidistile su ve

üzerine izole edilen DNA'dan 10 µL eklendi. Sırasıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak optik dansiteler (OD) belirlendi. 260 nm 'de 1 OD, 50 µg/mL DNA eşit varsayılır (46).

- DNA Konsantrasyonu (ng/µL) = OD260 X Sulandırma katsayısı(100) X 50/1000.
- Saflık = OD260/ OD280 formülüne göre hesaplandı.

DNA konsantrasyonu 100-200 ng/ µL, saflık değeri 1,5-1,9 olarak elde edilen örnekler kullanıldı. İzolasyonları yapılmış DNA'lar, dizi analizi yapılmaya kadar -20° C'de saklandı.

3.3.3.2. Amplifikasyon

β-globin gen bölgesi yaklaşık 1,6 kb büyüklüğündedir (7). DNA izole edildi. İki çift primer ile PCR yapıldı. Tüm primer çiftlerinin PCR çalışma protokolleri aynıdır. β-globin gen bölgesi için PCR hazırlama protokolü Tablo 3' te sunulmuştur.

Tablo 3. DNA amplifikasyon için PCR hazırlama protokolü.

BETA GLOBİN GEN BÖLGESİ			
1. BÖLGE		2. BÖLGE	
BİLEŞEN	Hacmi (µL)	BİLEŞEN	Hacmi (µL)
GML PCR Mix	7.5	GML PCR Mix	7.5
GML Taq. Polimeraz	0.2	GML Taq. Polimeraz	0.2
1. Bölge primer F	1.0	2. Bölge primer F	1.0
1. Bölge primer R	1.0	2. Bölge primer R	1.0
G/C Enhancer	2.0	G/C Enhancer	2.0
Distile Su	2.0	Distile Su	2.0
Genomic DNA (30-60 ng/µl)	1.5	Genomic DNA (30-60 ng/µl)	1.5
Total	15	Total	15

Her bir örnek için yukarıdaki PCR protokolüne göre amplifikasyon için karışım hazırlandı ve thermal cyler cihazında Tablo 4' teki sıcaklık ve sürelerde inkübe edildi (Şekil 13).

Tablo 4. Thermal cycler amplifikasyon döngüsü.

EVRE	TANIMLAMA	SICAKLIK	SÜRE
1	Polimeraz Aktivasyon	95 °C	10 dakika
2	Amplifikasyon (5 siklus)	95 °C	30 saniye
		50 °C	30 saniye
		72 °C	90 saniye
3	Amplifikasyon (5 siklus)	95 °C	30 saniye
		55 °C	30 saniye
		72 °C	90 saniye
4	Amplifikasyon (5 siklus)	95 °C	30 saniye
		59 °C	30 saniye
		72 °C	90 saniye
5	Uzama	72 °C	7 dakika
6	Bekleme	4 °C	Süresiz Tutma



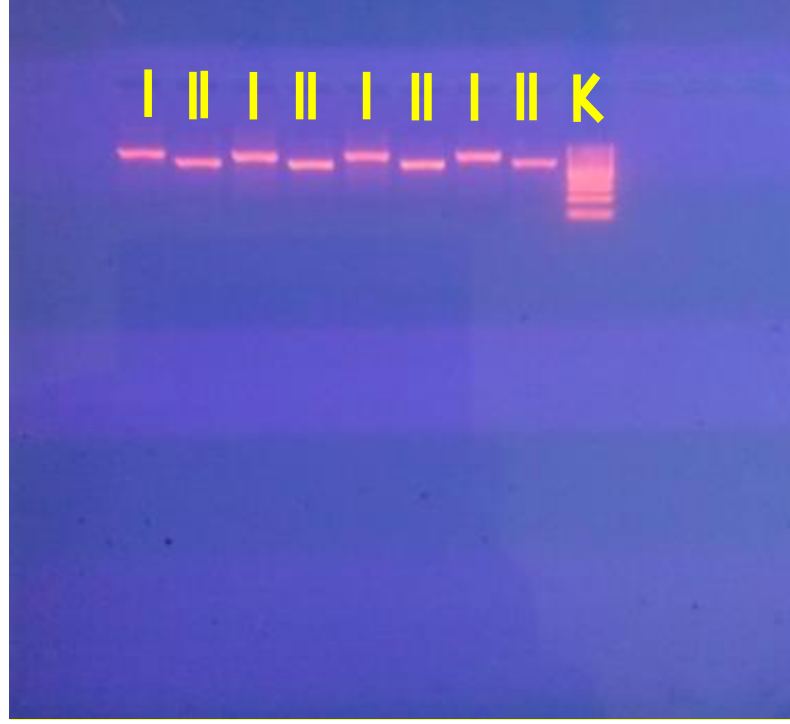
Şekil 13. Thermal cycler cihazı (Applied Biosystems, USA).

3.3.3.3. Jel elektroforezi

PCR sonrası amplifiye edilen ürünlerinin kalitesi için % 2' lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jelin hazırlanmasında 1X TBE tamponu kullanıldı. Jelde yürütülen örnekler kontrol PCR ürününe göre değerlendirildi ve amplifikasyon bandı görülen örnekler pürifiye edildi. Amplifiye ürünün agaroz jelde yürütme prensibi aşağıda özetlenmiştir.

- 1 g agaroz tartılarak 250 mL bir erlenmayere bırakıldı.

- Üzerine 50 mL 1X TBE tamponu eklendi (Stok 10X TBE tamponun 1:10 distile su ile seyreltilmesi ile hazırlandı).
- Mikrodalga fırında ısıtılıp, 1-2 dk kaynaması beklendi.
- Daha sonra ısıdan uzaklaştırıldı ve çeşme suyu altında yaklaşık 60-70°C' ye kadar soğutuldu.
- Üzerine 1 µL Etidium Bromide ilave edildi.
- Uygun tarak ve kalınlıkta daha önce hazırlanmış jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletildi.
- Taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel kabı, elektroforez tankına yerleştirildi.
- Elektroforez tankına jelin üst kısmında içine alacak şekilde 1X TBE tamponu bırakıldı.
- Jelde açılan kuyucuklara:
 - 5 µL PCR ürünü + 1 µL 6X Loading Dye solution ile karıştırılarak sırayla açılan kuyucuklara bırakıldı.
 - 2 µL 100 bp ladder ürünü + 1 µL 6X Loading Dye solution ile karıştırılarak ilk veya son kuyucuğa bırakıldı.
- Daha sonra 120-130 voltajda 30 dk yürütüldü.
- Yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı ile bantların varlığı incelendi.
- Bant görünen ürünler ile çalışmaya devam edildi. Görünmeyen ürünler için yeniden PCR yapıldı.



Şekil 14. Amplifiye edilmiş dört DNA örneğinin jel görüntüsü (I-II : β -globin gen birinci-ikinci bölgesi. K: 100 bp ladder).

3.3.3.4. Pürifikasyon (saflaştırma) işlemi

Pürifikasyon işlemi; PCR sonrasında arta kalan dNTP, enzim, $MgCl_2$, PCR buffer vb. arındırmak için yapılır. ExoSAP-IT reaktifiyle pürifikasyon işlemi yapıldı. Hazırlanan steril PCR tüplerine; amplifiye üründen 5 μ L + 2 μ l ExoSAP-IT eklendi ve iyice vortekslendi. Thermal cyler cihazında aşağıdaki sıcaklık ve sürelerde inkübe edildi.

EVRE	TANIMLAMA	SICAKLIK	SÜRE
1	Enzim aktivasyonu	37 °C	30 dk
2	Enzim inaktivasyonu	80 °C	15 dk
3	Bekleme	4 °C	Süresiz Tutma

3.3.3.5. Dizi analizi reaksiyonunun hazırlanması

Pürifikasyon işleminden sonra Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit ile floresan işaretli PCR yapıldı. Sekans PCR hazırlama protokolü her primer için ayrı ayrı hazırlandı. Her β -globin genin birinci ve ikinci bölgesi için forward (F) ve reverse (R) primerler kullanıldığından dolayı toplam 4 steril PCR tüpü hazırlandı.

Birinci tüp (1. Bölge F primeri için)

BİLEŞEN	Her örnek için hacim (μ l)
Big Dye terminator Mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
1. Bölge F	2.0
Distile Su	2.0
Total	8.0

İkinci tüp (1. Bölge R primeri için)

BİLEŞEN	Her örnek için hacim (μ l)
Big Dye terminator Mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
1. Bölge R	2.0
Distile Su	2.0
Total	8.0

Üçüncü tüp (2. Bölge F primeri için)

BİLEŞEN	Her örnek için hacim (μ l)
Big Dye terminator Mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
2. Bölge F	2.0
Distile Su	2.0
Total	8.0

Dördüncü tüp (2. Bölge R primeri için)

BİLEŞEN	Her örnek için hacim (µl)
Big Dye terminator Mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
2. Bölge R	2.0
Distile Su	2.0
Total	8.0

Sekans protokolüne göre hazırlanan PCR tüplerinin her birine 2 µL PCR ürünü eklendi ve vortekslendi. Böylece son hacim 10 µL olan tüpler, thermal cycler cihazında aşağıdaki sıcaklık ve sürelerde inkübe edildi.

EVRE	TANIMLAMA	SICAKLIK	SÜRE
1	Aktivasyon	96 °C	1 dk
2	Sekans (25 siklus)	96 °C	10 s
		50 °C	5 s
		60 °C	4 dk
3	Bekleme	4 °C	Süresiz Tutma

3.3.3.6. Sekans ürünlerinin saflaştırılması

Çalışma büyüklüğüne göre, çalışmadan bir gün önce; 1g sephadexs + 14 mL distile su protokolüne göre sephadexs solüsyonu hazırlandı ve +4° C şartlarında saklandı. Çalışma aşamasında 30 dk önce oda şartlarında bekletildi ve iyice vortekslendi. Her sekans PCR örneği için;

- 1mL spin purification kolona 750 µL saphadexs solüsyonu bırakıldı.
- 4600 rpm'de 3 dk santrifüj edildi (alt kısmı atıldı, üst kısmı temiz kolleksiyona bırakıldı).
- Elde edilen sephadexs koleksiyonuna uygun pozisyonda, 10 µL sekans PCR örneği bırakıldı.
- 4600 rpm'de 3 dk santrifüj edildi (üst kısmı atıldı, **alt kısmı saflaştırılmış sekans PCR**).

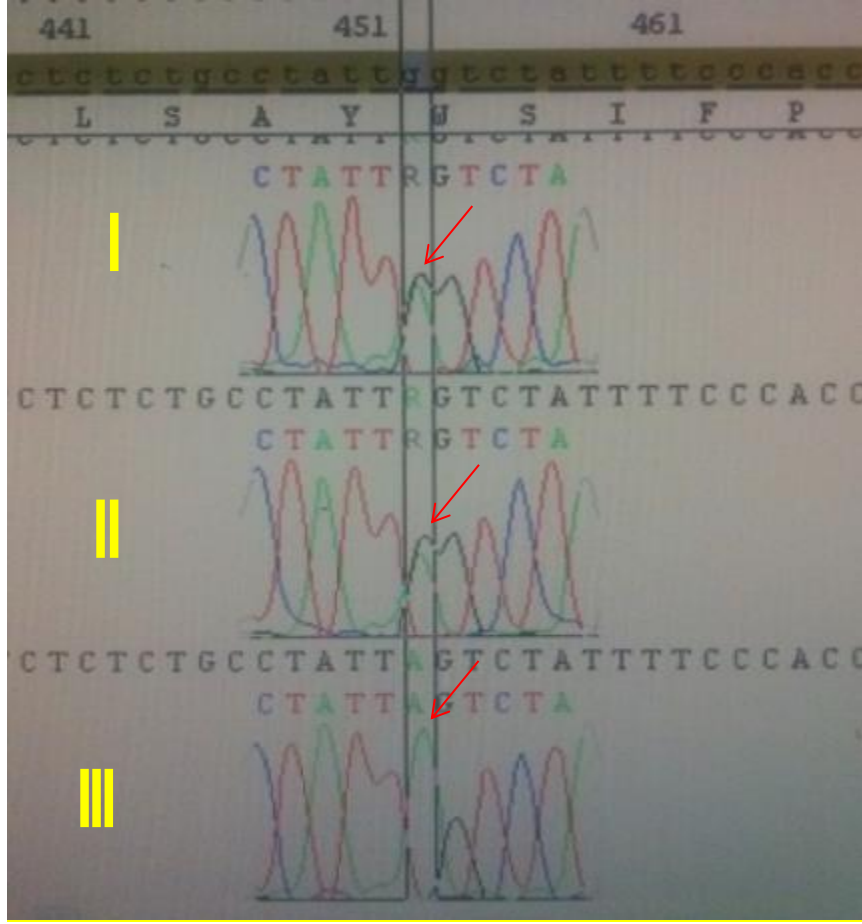
3.3.3.7. Dizi analizi işlemi

Saflaştırılmış sekans ürünü, dizi analizi yapmak için uygun çalışma tüplerine aktarıldı ve dizi analizi (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA) cihazına uygun sırayla aktararak kapiller elektroforez yöntemiyle analiz edildi. Cihazda Sequencing Analyses programı (SeqScape Software v2.6) ile DNA dizi analizi işlemi gerçekleştirildi (Şekil 15).

Çalışılan hastalarda β -globin gen nükleotid dizileri SeqScape Software v2.6 programı kullanılarak orijinal β -globin gen bölgesi nükleotid dizisi ile karşılaştırılarak hastalarda varolan mutasyonlar tespit edildi.



Şekil 15. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)



Şekil 16. Anne ve babadan çocuğa geçen IVS I-110 (G->A) mutasyonuna ait elektroferogram görüntüsü örneği (I = baba, II = anne, III= çocuk). Anne ve baba heterozigot IVS I-110 (G->A), çocukta homozigot IVS I-110 (G->A) mutasyon görüntüsü.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) versiyon paket programı ve Microsoft Office Excel 2010 sürümü kullanılarak yapıldı. Çalışma verilerinin analizi için tanımlayıcı istatistik kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikte sayısal değişkenler için ortalama \pm standart sapma ve minimum-maksimum, kategorik veriler için sayı ve yüzde oranları kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan BTM' li hastalar periyodik bir şekilde eritrosit süspansiyonu almaktaydılar (3-4 hafta / periyod). BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde; hemogram sayımı ve HPLC ile hesaplanan Hb varyant düzeyleri Tablo 5' te sunulmuştur.

Tablo 5. BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde görülen hemogram sayımı ve Hb varyant düzeyleri.

SIRA	RBC (M/uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	RDW (%)	HbF (%)	HbA (%)	HbA2 (%)
1H	3.31	9.1	24.8	75	27	36.5	15.1	7.26	89.94	2.80
1A	5.52	11.6	33.6	61	21	34.4	15.6	2.24	94.88	2.88
1B	6.61	12.6	37.3	56	19	33.9	21.6	1.05	93.93	5.01
2H	2.7	7.8	20.5	76	29	38.2	16.1	7.58	89.35	3.07
2A	5.24	9.9	30.6	58	19	32.4	21.9	0.51	95.63	3.86
2B	6.21	13	38.5	62	21	33.8	17.3	2.07	93.02	4.92
3H	2.91	8.5	22.7	78	29	37.2	19.3	30.51	66.21	3.28
3A	5.43	12.1	35.7	66	22	33.8	17	2.24	90.85	6.92
3B	6.75	14.1	42	62	21	33.5	19.8	4.36	90.27	5.37
4H	3.93	11.2	33.7	86	29	33.2	14.3	4.00	93.30	2.70
4A	4.95	11.5	34.5	70	23	33.3	16.8	1.37	94.14	4.49
4B	7.14	14.5	46.2	65	20	31.3	20.5	0.77	94.33	4.90
5H	2.94	8.1	23.2	79	28	34.8	15.4	3.84	93.96	2.20
5A	5.7	11.7	38.3	67	21	30.6	17	0.76	94.76	4.47
5B	3.95	10.2	33.1	84	26	30.9	18.9	1.03	92.75	6.22
6H	3.4	9.7	27.1	80	28	35.6	15.1	5.97	91.43	2.60
6A	5.76	10.6	33	57	18	32	19.7	0.58	94.91	4.51
6B	6.59	14.1	42.1	64	22	33.6	18.2	1.24	93.57	5.18
7H	2.39	6.8	20.2	84	28	33.5	16.3	1.93	95.98	2.10
7A	5.38	10.1	33.3	62	19	30.4	18.9	0.77	95.63	3.60
7B	5.97	13.4	42.4	71	22	31.5	16.2	1.50	93.57	4.92
8H	3.49	9.6	28.9	83	28	33.2	14	11.63	85.64	2.72
8A	6.3	13.7	44	70	22	31.2	17.4	35.71	58.60	5.70
8B	5.5	12.9	40.2	73	24	32.1	21.6	41.86	53.45	4.69
9H	3.36	9	27.9	83	27	32	21.4	25.55	71.00	3.46
9A	5.15	12.5	36.3	70	24	34.5	15.3	0.66	94.41	4.93
9B	5.39	13.1	38.8	72	24	33.9	17	0.47	93.97	5.56
10H	3.35	8.4	23	69	25	36.6	19.8	18.03	79.67	2.31
10A	6.57	12.2	35.7	54	19	34.2	18.9	2.98	92.25	4.77

10B	7.97	16.8	47.6	60	21	35.2	16.3	0.68	93.72	5.59
11H	2.78	8	22.4	81	29	35.9	14.8	4.25	93.32	2.43
11A	5.14	10.3	32.5	63	20	31.8	19.6	3.27	91.92	4.81
11B	7.44	16.2	44.6	60	22	36.3	20.1	0.60	94.00	5.40
12H	2.76	7.9	23.9	86	29	32.9	16.8	8.84	88.31	2.85
12A	4.79	9.5	29.8	62	20	31.7	19.1	3.21	91.06	5.73
12B	5.15	12.3	36.3	71	24	33.9	18.4	8.77	85.76	5.48
13H	3.05	8.2	23.1	76	27	35.3	15.2	5.23	92.20	2.57
13A	4.42	9.1	28.8	65	21	31.5	18.8	0.42	95.12	4.46
13B	7.19	13.9	40.2	56	19	34.5	19.9	0.58	94.57	4.85
14H	2.9	8.3	22.8	79	28	36.2	18.5	5.24	92.30	2.47
14A	5.07	10.4	31.5	62	21	32.9	17.7	1.14	93.61	5.25
14B	6.44	13	38.6	60	20	33.7	18.8	0.54	93.32	6.14
15H	3.38	9.5	25.8	76	28	36.8	19.6	25.52	71.60	2.88
15A	5.32	10.7	31.8	60	20	33.5	17.2	1.23	92.98	5.79
15B	6.66	14	41.9	63	21	33.5	18.3	1.06	92.97	5.97
16H	4.18	12.2	34.1	82	29	35.9	16.7	0.96	96.54	2.50
16A	5.31	11.6	33.9	64	22	34.1	15.7	0.91	93.55	5.54
16B	6.87	14.4	43.9	64	21	32.8	16.4	0.80	94.15	5.06
17H	3.55	9.5	26	73	27	36.3	18.1	28.82	68.40	2.78
17A	5.93	11.5	34.3	58	19	33.5	18.6	1.10	94.48	4.42
17B	6.31	13.9	40.3	64	22	34.5	19.1	0.77	94.60	4.62
18H	2.93	8.6	23.4	80	29	36.7	16.2	7.08	90.22	2.70
18A	5.59	11.8	35.5	64	21	33.1	17.9	4.40	90.42	5.17
18B	6.12	13.3	39	64	22	34.1	18	1.51	94.08	4.41
19H	3.28	9.3	25.1	77	29	37.2	16.5	6.78	91.22	2.00
19A	5.61	11.6	34.7	62	21	33.4	17.9	1.24	94.51	4.25
19B	6.4	13.5	39.6	62	21	34.1	16.5	1.25	93.50	5.25
20H	3.45	9.9	26.6	77	29	37.1	14.7	4.18	93.08	2.74
20A	5.3	11.4	32.6	62	21	34.8	24.3	9.62	85.05	5.33
20B	6.37	13.2	38.5	61	21	34.3	19.6	1.75	92.58	5.67
21H	4.26	12.3	36	85	29	34.2	14.4	3.16	94.14	2.70
21A	4.81	10.2	29.6	62	21	34.4	17.4	4.52	90.52	4.95
21B	6.74	13.4	39.9	59	20	33.7	16.9	0.61	93.15	6.24
22H	3.49	10.6	28.4	81	30	37.2	14.4	3.21	94.05	2.74
22A	5.62	12	34.6	62	22	34.8	19.5	0.51	93.88	5.61
22B	5.62	12.6	35.7	64	22	35.3	18.5	0.99	93.90	5.11
23H	3.16	9.4	24.1	76	30	39	17.3	18.16	78.91	2.93
23A	5.37	11.3	34.5	64	21	32.7	20.2	4.08	90.55	5.37
23B	5.81	12.5	39.3	68	22	31.9	17.7	1.60	93.40	5.00

24H	2.97	8.8	24.7	83	30	35.6	16.3	6.83	90.42	2.75
24A	5.67	11.4	34.3	61	20	33.2	15.2	1.15	93.03	5.82
24B	6.15	13.2	39.7	65	21	33.2	19.5	0.45	93.80	5.75
25H	3.88	10.7	29.7	77	28	36.1	13.8	4.41	93.10	2.49
25A	5.95	12.7	37.5	63	21	33.8	16.5	0.71	94.45	4.83
25B	6.29	13.4	40.1	64	21	33.4	18.1	0.95	94.28	4.77
26H	3.54	8.1	21.1	60	23	38.2	31.5	56.62	40.38	2.99
26A	5.79	12.2	35.8	62	21	34.1	17.3	1.87	92.67	5.47
26B	6.57	13.9	39.9	61	21	34.7	19	0.98	93.76	5.26
27H	3.88	11.1	30.5	79	29	36.4	13.9	4.02	93.16	2.83
27A	5.09	11	31	61	22	35.5	20.3	0.89	93.09	6.01
27B	6.36	12.6	37.1	58	20	33.9	19.4	0.83	93.88	5.28
28H	2.86	8.8	23.6	82	31	37.3	14.8	8.34	88.65	3.01
28A	5.71	12.3	36.4	64	22	33.8	18.9	0.42	94.36	5.22
28B	6.78	13.3	39.1	58	20	34	20.7	1.52	91.90	6.58
29H	3.08	9.4	26.2	85	31	36	18	4.63	92.36	3.01
29A	4.9	9.8	30.3	62	20	32.4	18.7	1.14	93.36	5.50
29B	6.6	14.1	41.4	63	21	34.1	18	3.33	91.27	5.40
30H	2.58	7.9	21.1	82	30	37.2	15.9	6.05	90.87	3.08
30A	5.11	10.6	31.5	62	21	33.8	17.1	0.79	94.32	4.88
30B	6.1	13.4	39.5	65	22	33.9	18.8	0.88	93.96	5.16

1., 2., 3.: Aile Sırası H: Hasta A: Anne B: Baba

BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde; hemogram sayımı ve Hb varyant düzeylerinin istatistiksel verileri Tablo 6 ve Tablo 7 ' de sunulmuştur.

Tablo 6. BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde görülen hemogram sayımı istatistiği.

SIRA	İstatistik	RBC (M/uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	RDW (%)
HASTA	X ±SD ¹	3.25± 0.46	9.20±1.32	25.68±4.03	78.93±5.46	28.32±1.65	35.94±1.68	16.80±3.39
	Min-maks ²	2.39-4.26	6.76-12.30	20.20-36.00	59.50-86.40	22.70-30.70	32.00-39.00	13.80-31.50
ANNE	X ±SD ¹	5.41±0.45	11.24±1.04	33.86±3.08	62.59±3.57	20.77±1.29	33.18±1.28	18.21±1.95
	Min-maks ²	4.42-6.57	9.08-13.70	28.80-44.00	54.40-70.40	18.30-24.30	30.40-35.50	15.20-24.30
BABA	X ±SD ¹	6.33±0.74	13.49±1.15	40.09±2.98	63.81±5.74	21.42±1.49	33.65±1.18	18.63±1.48
	Min-maks ²	3.95-7.97	10.20-16.80	33.10-47.60	55.80-83.80	19.10-25.90	30.90-36.30	16.20-21.60

X ±SD¹: Ortalama ± Standart Sapma. Min-maks²: Minumum – Maksimum

Tablo 7. BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde görülen Hb varyant istatistiği.

SIRA	İstatistik	HbF (%)	HbA (%)	HbA2 (%)
HASTA	X ±SD ¹	10.95 ± 11.94	86.32 ± 12.09	2.72 ± 0.32
	Min-maks ²	0.96 – 56.62	40.38 - 96.54	2.00 - 3.46
ANNE	X ±SD ¹	3.01 ± 6.46	91.97 ± 6.66	5.02 ± 0.79
	Min-maks ²	0.42 - 35.71	58.60 - 95.63	2.88 - 6.92
BABA	X ±SD ¹	2.83 ± 7.54	91.85 ± 7.44	5.33 ± 0.52
	Min-maks ²	0.45 – 41.86	53.45 - 94.60	4.41 - 6.58

X ±SD¹: Ortalama ± Standart Sapma. Min-maks²: Minimum – Maksimum

BTM' li hastalarda ve ebeveynlerinde dizi analizi sonucunda tespit edilen mutasyonlar ve sıklığı Tablo 8, Tablo 9 ve Şekil 17' de sıralanmıştır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz mutasyonlarla birlikte görülen SNP olarak tanımlanan 4 çeşit tek nükleotid polimorfizmler Tablo 8' de sunulmuştur.

Tablo 8. BTM' li hastalar ve ebeveynlerinde tespit edilen mutasyonlar ve SNP' ler.

MUTASYONLAR			POLİMORFİZMLER (HETEROZİGOT= 1) (HOMOZİGOT= 2)			
SIRA	1. MUTASYON	2. MUTASYON	c.-31 C > T	KODON-2 (T>C)	IVS-II-16 (G>C)	IVS-II-666 (C>T)
1A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2	
1B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2	
2H	IVS I-110 (G->A) HOMOZİGOT		2		2	
2A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		1		1	
2B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2		2	
3H	IVS II-1 (G->A) HOMOZİGOT		2	2	2	
3A	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2	
3B	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT		1	1	1	
4H	IVS I-110 (G->A) HOMOZİGOT		2	2	2	
4A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2	
4B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2	
5H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	Kodon 8 (-AA) HETEROZİGOT	1	1	1	

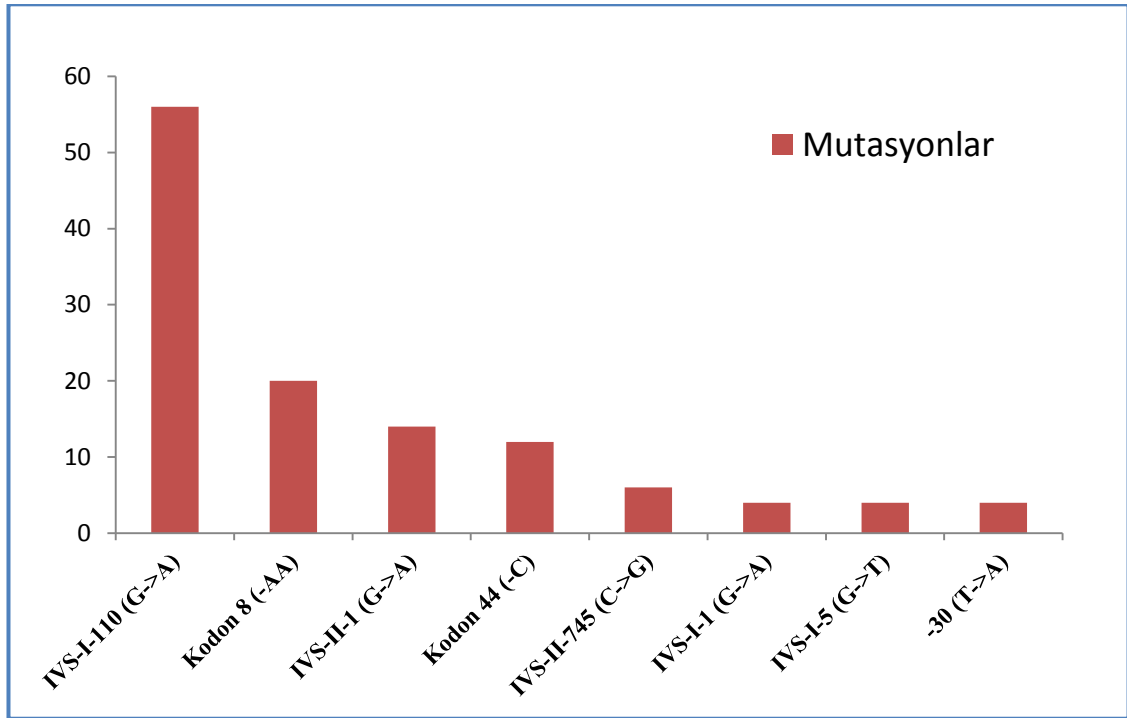
5A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
5B	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT			1	1
6H	IVS I-110 (G->A) HOMOZIGOT		2	2	2
6A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
6B	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
7H	IVS I-110 (G->A) HOMOZIGOT		2	2	2
7A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
7B	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
8H	IVS I-110 (G->A) HOMOZIGOT		2	2	2
8A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
8B	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
9H	-30 (T->A) HOMOZIGOT		2		2
9A	-30 (T->A) HETEROZIGOT		1		1
9B	-30 (T->A) HETEROZIGOT		1	1	1
10H	IVS I-110 (G->A) HOMOZIGOT		2	2	2
10A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
10B	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
11H	KODON-44 (-C) HOMOZIGOT		2	2	2
11A	KODON-44 (-C) HETEROZIGOT		2	2	2
11B	KODON-44 (-C) HETEROZIGOT		2	2	2
12H	Kodon 8 (-AA) HOMOZIGOT				
12A	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT		1	1	
12B	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT		1	1	
13H	IVS I-1 (G->A) HETEROZIGOT	IVS I-110 (G->A)HETEROZIGOT	2	2	2
13A	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
13B	IVS I-1 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
14H	Kodon 8 (-AA) HOMOZIGOT				
14A	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT		1	1	1
14B	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT			1	
15H	IVS II-1 (G->A) HOMOZIGOT		2	2	2
15A	IVS II-1 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
15B	IVS II-1 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
16H	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT	Kodon 44 (-C) HETEROZIGOT	2	2	2
16A	Kodon 44 (-C) HETEROZIGOT		2	2	2
16B	IVS I-110 (G->A) HETEROZIGOT		2	2	2
17H	Kodon 8 (-AA) HOMOZIGOT				
17A	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT				
17B	Kodon 8 (-AA) HETEROZIGOT		1	1	1
18H	IVS I-5 (G->C) HOMOZIGOT		2	2	2
18A	IVS I-5 (G->C) HETEROZIGOT		2	2	2
18B	IVS I-5 (G->C) HETEROZIGOT		2	2	2

19H	IVS I-110 (G->A) HOMOZİGOT		2	2	2
19A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
19B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
20H	IVS I-1 (G->A) HETEROZİGOT	IVS II-1 (G->A)HETEROZİGOT	2	2	2
20A	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
20B	IVS I-1 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
21H	Kodon 8 (-AA) HOMOZİGOT		2	1	1
21A	Kodon 8 (-AA) HETEROZİGOT		2	1	1
21B	Kodon 8 (-AA) HETEROZİGOT		2	1	1
22H	IVS I-110 (G->A) HOMOZİGOT		2	2	2
22A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
22B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		1	1	1
23H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	IVS II-1 (G->A)HETEROZİGOT	2	2	2
23A	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT		1	1	1
23B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
24H	Kodon 44 (-C) HOMOZİGOT		2	2	
24A	Kodon 44 (-C) HETEROZİGOT		2	2	
24B	Kodon 44 (-C) HETEROZİGOT		2	2	
25H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	IVS II-745 (C->G)HETEROZİGOT	1	1	1
25A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
25B	IVS II-745 (C->G)HETEROZİGOT		1	1	1
26H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	Kodon 44 (-C)HETEROZİGOT	2	2	2
26A	Kodon 44 (-C) HETEROZİGOT		2	2	2
26B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
27H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	Kodon 8 (-AA) HETEROZİGOT	1		1
27A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2		2
27B	Kodon 8 (-AA) HETEROZİGOT		1		
28H	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT	2	2	2
28A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
28B	IVS II-1 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
29H	IVS I-110 (G->A) HOMOZİGOT		2	2	2
29A	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
29B	IVS I-110 (G->A) HETEROZİGOT		2	2	2
30H	IVS II-745 (C->G) HOMOZİGOT		2		
30A	IVS II-745 (C->G) HETEROZİGOT		1	1	1
30B	IVS II-745 (C->G) HETEROZİGOT		1		

1., 2., 3.: Aile Sırası H: Hasta A: Anne B: Baba

Tablo 9. Tespit ettiğimiz mutasyonların tipleri, mekanizmaları, fenotipik özellikleri ve sıklığını göstermektedir.

MUTASYON TİPİ	MEKANİZMASI	FENOTİPİ	SAYI(N)	YÜZDE(%)
IVS I-110 (G->A) (HBB:c.93-21G>A)	RNA işlenmesi	β^+	56	46.67
Kodon 8 (-AA) (HBB:c.25_26delAA)	Çerçeve kayması	β^o	20	16.67
IVS II-1 (G->A) (HBB:c.315+1G>A)	RNA işlenmesi	β^o	14	11.67
Kodon 44 (-C) (HBB:c.135delC)	Çerçeve kayması	β^o	12	10.00
IVS II-745 (C->G) HBB:c.316-106C>G	RNA işlenmesi	β^+	6	5.00
IVS I-1 (G->A) (HBB:c.92+1G>A)	RNA işlenmesi	β^+	4	3.33
IVS I-5 (G->T) (HBB:c.92+5G>T)	RNA işlenmesi	β^+	4	3.33
-30 (T->A) (HBB:c.-80T>A)	Transkripsiyonel Mutasyon	β^+	4	3.33
TOPLAM			120	100



Şekil 17. Tespit ettiğimiz mutasyonların histogram dağılımı.

5. TARTIŞMA

BT, dünyada en yaygın görülen otozomal resesif hastalıklardan biridir (7). BT, β -globin zincirlerinin sentezinde azalma (β^+) veya yokluğuna (β^0) bağlı olarak oluşur (3,7). BT, Türkiye'yi de içine alan Akdeniz Ülkeleri, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan, Güney Çin ve Uzak Doğu ile Kuzey Afrika kıyıları ve Güney Amerika'da yaygındır (7). Dünyada BTT % 1.5 düzeyinde olup yaklaşık 100 milyon taşıyıcı vardır (4,7). En yüksek insidans Kıbrıs (% 14), Sardunya (% 12) ve Güneydoğu Asya'da bildirilmiştir (7). Türkiye'de BTT ortalama insidansı % 2,1 ve bazı bölgelerde ise % 0,6-11,7 arasında olduğu bildirilmiştir (5). Farklı etnik gruplar arasında göç ve evlilik nedeniyle dünyanın hemen her ülkesinde BT görülmektedir (3). β -globin gen bölgesinde şimdiye kadar 200' den fazla mutasyon bildirilmiştir ve büyük çoğunluğu nokta mutasyonlar oluşturmaktadır (7,47). Türkiye toplumunda mutasyon çeşitliliği açısından bölgesel farklılıklar mevcut olup, 40 dan fazla mutasyon çeşidi tanımlanmıştır (6,8,9).

BT klinik ve hematolojik bulgularının şiddetine göre; BTT, BTI ve BTM olmak üzere üçe ayrılır (3,7). Nadir dominant formlar dışında BTT çoğunlukla heterozigottur ve BTM ve BTI homozigot veya birleşik heterozigot formda görülür (3). BTT hastaları genellikle klinik olarak asemptomatik olup bazen hafif bir anemi görülebilir (3,7). Transfüzyon bağımlısı BTM' li hastalarda ciddi bir anemi görülür. BT' de klinik şiddet alfa globin ve nonalpha globin zincirleri arasındaki dengesizliğin ölçüsüyle ilişkilidir (7). BT'de RBC indeksi mikrositer anemi göstermektedir. BTM' de Hb <7 g/dl, MCV 50-70 fl, MCH 12-20 pg; BTI' da, Hb 7-10 g/dl, MCV 50-80 fL, MCH 16- 24 pg. BTT' de MCV ve MCH düşüklüğü ile Hb A2 artışı gözlenir. BT türüne göre çeşitli Hb varyantları görülür. β^0 -talasemide: Homozigot durumda HbA yoktur ve total Hb % 92-95 HbF oluşturmaktadır (3). β^+ -talasemide: Homozigot veya birleşik β^0/β^+ durumda HbA % 10-30 ve HbF % 70-90 arasında görülür. Homozigot BT' de HbA2 değişkendir (3). BTT hastalarında HbA % 92-95, HbA2 > % 3.8 ve HbF % 0.5-4 düzeylerinde görülür

(23). Etkilenen hastalarda düzenli ömür boyu eritrosit süspansiyonu ve aşırı demir birikimini engellemek için şelasyon tedavisi almaları gerekir (27). Normal büyüme ve gelişme eğilimi için, düzenli transfüzyon programıyla Hb konsantrasyonu minimum 9,5-10,5 g/dL seviyede tutulması önerilmektedir (3,27).

BTT' li kişilerde normal bir yaşam beklentisi vardır. Kemik iliği nakli BTM' li bazı çocuklar için küratif tedavi sağlayabilir. Şimdilik kemik iliği nakli dışında kalıcı tedavisi yoktur. Fakat BTM' li kişiler genellikle aşırı demir yükünün kalp komplikasyonları sonucu 30 yaşından önce ölmektedir (3,7,27).

Urrechaga ve ark. BTT' li 200 hastada yaptıkları çalışmada, hematolojik analizleri flow sitometrik yöntemle çalışmış olup, RBC 5.79 M/uL, Hb 11.9 g/dL, MCV 64.6 fL, MCH 20.6 pg, RDW % 16.1 değerlerini tespit etmişlerdir (48).

Kainimoghaddam ve ark. BTT' li 14 ebeveynde yaptıkları çalışmada, hematolojik analizlerinde **erkeklerde:** RBC 6.60±0.44 M/uL, Hb 13.66±1.19 g/dL, MCV 65.62±2.76 fL, MCH 20.28±1.21 pg; **kadınlarda:** RBC 5.37±0.62 M/uL, Hb 10.82±1.94 g/dL, MCV 67.04±3.20 fL, MCH 20.10±1.62 pg değerlerini tespit etmişlerdir (49).

Kızılar ve ark.'nın 35 (19 erkek, 16 kadın) BTT hastalarda yaptıkları çalışmada, hematolojik analizler flow sitometrik yöntemle yapılmış olup, RBC 3.64±0.28 M/uL, Hb 10.90±1.02 g/dL, Hct % 32.77±2.22 olarak tespit edilmiştir (50).

Oğuz ve ark.'nın 2003 - 2004 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Pediatri Polikliniğine başvuran BTT tanısı almış 15 hastada yaptıkları çalışmanın hemogram analizlerinde; RBC 5.37±0.56 M/uL, Hb 9.96±1.02 g/dL, Hct % 31.21±3.79, MCV 58.19 ±5.31 fL, RDW % 16.63 ±1.34 olarak tespit edilmiştir (51).

Rahim ve ark.'nın 94 BTT'li hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, hematolojik analizleri flow sitometrik yöntemle çalışılmış olup, RBC 5.94±0.7 M/uL, Hb 11.6±1.42 g/dL, MCV 61.41±5.21 fL, MCH 19.45±2.00 pg, MCHC % 36.12±4.37 g/dL, RDW % 15.12±2.37 olarak tespit edilmiştir (52).

Eryılmaz ve ark. Hatay ili ve çevresinde BT ile ilgili prevalans çalışmalarında 42 BTT'li hasta tespit etmişlerdir. Hematolojik analizlerinde, RBC 4.63±1.02 M/uL, Hb 9.85±1.4 g/dL, Hct % 30.56±4.45, MCV 67.67±9.99 fL, MCH

21.90±3.40 pg, MCHC % 32.36±1.64, RDW % 59.87±23.03 düzeyleri tespit edilmiştir (53).

Gerçik ve ark. Van ili çevresinde BT prevalans çalışmasında 26 BTT' li hasta tespit etmişler. Hematolojik analizler flow sitometri yöntemiyle çalışılmış. **Erkeklerde:** RBC 5.99±0.47 M/uL, Hb 11.47±1.02 g/dL, Hct % 35.11±4.01, MCV 62.99±5.01 fL, MCH 21.57±3.65 pg, MCHC 32.05±1.00g/dL, RDW % 14.06±2.22 ve **Kadınlarda:** RBC 5.49±0.52M/uL, Hb 10.85±0.75 g/dL, Hct % 32.93±2.10, MCV 61.79±5.51 fL, MCH 21.03±2.98 pg, MCHC %32.71±1.32, RDW % 13.63±1.34 düzeyleri tespit etmişlerdir (54).

Çalışmamıza BTT tanısı almış 30 ebeveyn dahil edildi. Hematolojik analizler flow sitometri yöntemiyle çalışıldı. **Erkeklerde:** RBC 6.33±0.74 M/uL, Hb 13.49±1.15 g/dL, Hct % 40.09±2.98, MCV 63.81±5.74 fL, MCH 21.42±1.49 pg, MCHC % 33.65±1.18, RDW % 18.63±1.48 değerler tespit edildi. **Kadınlarda:** RBC 5.41±0.45 M/uL, Hb 11.24±1.04 g/dL, Hct % 33.86±3.08, MCV 62.59±3.57 fL, MCH 20.77±1.29 pg, MCHC % 33.18±1.28, RDW % 18.21±1.95 olarak tespit edildi. Çalışmamızda BTT' li ebeveynlerinde; Hb, MCV ve MCH düşüklüğü gözlemlendi. Verilerimiz BTT' li hastalarda görülen laboratuvar bulgularıyla uyumlu görüldü (3). Urrechaga ve ark., Kainimoghaddam ve ark., Rahim ve ark. çalışmalarlarıyla benzer sonuçlar elde edildi. Kızıler ve ark., Oğuz ve ark., Eryılmaz ve ark. ve Gerçik ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarla karşılaştığımızda, Hb düzeyi düşüklüğü dışında benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Şimşek ve ark. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde BTM' li hastalarda oksidan ve antioksidan düzeylerini araştırdıkları çalışmada, BTM' li hastalara düzenli olarak eritrosit süspansiyon transfüzyonu yapıldığını vurgulamışlardır. 11 BTM' li hastanın hematolojik analizlerinde: RBC 3.25±0.6 10 M/uL, Hb 9.25±1.74 g/dL, Hct % 27.07±4.65, MCV 82.79±3.74 fL, MCH 27.98±1.9 pg, RDW % 15.19±2.86 olarak tespit edilmiştir (55).

Balcı ve ark. Denizli Devlet Hastanesi Talasemi Merkezinde takip edilen 92 (50 erkek, 46 kadın) BTM' li hastada retrospektif olarak yaptıkları çalışmada, BTM' li hastalara düzenli olarak eritrosit süspansiyon transfüzyonu yapıldığını vurgulamışlardır. Hb 9.30±0.58 g/dL, MCV 79.5±2.8 fL olarak tespit edilmiştir (56).

Eryılmaz ve ark. Hatay ili ve çevresinde BT ile ilgili prevalans çalışmasında 30 BTM hastası tespit edilmiştir. Düzenli olarak eritrosit süspansiyon transfüzyonu yapılan hastalarda, RBC 3.47 ± 0.38 M/uL, Hb 8.98 ± 1.04 g/dL, Hct % 27.35 ± 3.22 , MCV 79.09 ± 3.96 fL, MCH 25.94 ± 1.25 pg, MCHC % 32.81 ± 1.39 , RDW % 44.32 ± 7.09 olarak saptanmıştır (53).

Bizim de çalışmamızda BTM tanısı almış 30 hastada, hematolojik analizler flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Düzenli olarak eritrosit süspansiyon transfüzyonu alan hastalarda; RBC 3.25 ± 0.46 M/uL, Hb 9.20 ± 1.32 g/dL, Hct % 25.68 ± 4.03 , MCV 78.93 ± 5.46 fL, MCH 28.32 ± 1.65 pg, MCHC % 35.94 ± 1.68 , RDW % 16.80 ± 3.39 olarak tespit edildi. Gerek bizim çalışmamız ve gerekse diğer çalışmalarda, BTM hastaları periyodik bir şekilde eritrosit süspansiyonu almaktaydı. Normalde transfüzyon almayan BTM' li hastalarda; Hb < 7 g/dl, MCV 50-70 fL, MCH 12-20 pg düzeylerinde ağır hipokrom-mikrositer anemi beklenir (3). Halbuki çalışmamızda ve diğer çalışmalarda düzenli eritrosit süspansiyonu aldıkları için, hafif-orta derecede hipokrom-mikrositer anemi görüldü. BTM hastalarında normal büyüme ve gelişme eğilimi için, Hb konsantrasyonunun minimum 9.5-10.5 g/dL seviyede tutulması önerilmektedir (3). Çalışmamızda bunu destekleyen sonuçlar elde edildi. Sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir.

Yapıcı ve ark. Mersin ili ve çevresinde β -talasemi ve orak hücre taşıyıcılığı sıklığı ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, 274 (134 erkek, 140 kadın) BTT hastada Hb varyant düzeyleri alkali Hb elektroforez yöntemiyle çalışmış olup, HbA2 \geq % 3 ve/veya HbF \geq % 2.0 olarak yüksek tespit edilmiştir (57).

Öney ve ark. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Talasemi Tanı, Tedavi ve Araştırma Ünitesinde takibi yapılan 84 (36 erkek, 48 kadın) BTT hastalarını incelemeye almışlar. Hastaların Hb varyant düzeyleri HPLC yöntemiyle çalışmış olup, ortalama Hb A2 $>$ % 5 ve ortalama Hb F $>$ % 1.5 değerleri tespit edilmiştir (58).

Hazan ve ark. BTM prenatal tanı analizi yapılan üçüz olgu ile ilgili çalışmalarında: 17 haftalık gebe anne adayında; HbA2 % 5.6, HbF % 2.5, baba adayında; HbA2 % 4.9, HbF % 2.8 değerleri tespit etmişlerdir (59).

Gerçik ve ark. Van ili ve çevresinde BT prevalans çalışmasında 26 kişiye BTT tanısı konmuş olup, hastaların Hb varyant düzeyleri alkali Hb elektroforezi

yöntemiyle çalışılmıştır. Erkeklerde; HbA % 95.28±1.63, HbA2 % 4.74±1.64 ve kadınlarda; HbA % 95.13±0.86, HbA2 % 4.88±0.86 olarak rapor edilmiştir (54).

Kainimoghaddam ve ark. BTT tanısı almış 14 ebeveyn üzerinde yaptıkları çalışmada, hastaların Hb varyant düzeyleri HPLC yöntemiyle çalışılmış olup erkeklerde; HbA2 % 4.76±0.87 ve kadınlarda; HbA2 % 5±0.57 olarak rapor edilmiştir (49).

Bizim çalışmada da BTT' li 30 ebeveynin Hb varyant düzeyleri HPLC yöntemiyle ölçüldü. **Kadınlarda:** HbA % 91.97±6.66, HbF % 3.01±6.46, HbA2 % 5.02±0.79 ve **erkeklerde:** HbA % 91.85±7.44, HbF % 2.83±7.54, HbA2 % 5.33±0.52 düzeyleri tespit edildi. Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer sonuçlar elde edildi. Normalde BTT' li hastalarda; HbA % 92-95, HbA2 % >3.8 ve HbF % 0.5-4 düzeyinde değerler görülür (23). Sonuçlarımızın BTT ile uyumlu olduğu görüldü.

BTM' li 30 hastanın Hb varyant düzeyleri HPLC yöntemiyle çalışıldı. Hastalarda: HbA % 86.32±12.09, HbF % 10.95±11.94, HbA2 % 2.72±0.32 düzeyleri tespit edildi. Hastaların düzenli olarak eritrosit süspansiyon transfüzyonu almaları nedeniyle çıkan veriler, transfüzyon yapılmayan BTM hastaların Hb varyant düzeyleriyle uyumlu değildi (3). Normalde doğumdan sonra HbF yerini yavaş yavaş HbA'ya bırakır, 2 yaşlarında total hemoglobinin yaklaşık % 1'ini HbF oluşturmaktadır (10). Elde ettiğimiz HbF düşüklüğü, HbA yüksekliği hastaların tedavisinin düzenli yapıldığını göstermektedir.

İnce ve ark. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalardan rastgele 36 BTM tanısı almış hastalarda yaptıkları çalışmada ARMS yöntemi ile mutasyonlar tespiti için Türkiye'nin Güneydoğu Bölgesinde sık görülen 8 çeşit mutasyonu analiz etmişlerdir. Mutasyon sıklığına göre: IVS-I-110 (G->A) % 27.8, IVS-I-6 (T->C) % 11.1, Kodon 8 (-AA) % 11.1, IVS-II-1 (G->A) % 8.3, IVS-II-745 (C->G) % 5.5, IVS-I-1 (G->A) % 2.8, -30 (T->A) % 2.8, Kodon 39 (C->T) % 2.8, bilinmeyen % 27.8 olarak tespit edilmiştir (60).

Gülbay ve ark. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezine başvuran ve BT tanısı alan 38 kişiden 32' sinde (% 84.2) β -globin Strip Assay kiti ile 9 çeşit mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyonlar sıklık sırasına göre; IVS-I-110 (G->A) % 47.4, IVS-I-1 (G->A) %15.8, IVS-II-1 (G->A) %7.9, Kodon 8 (-AA) % 7.9,

Kodon 8/9 (+G) %7.9, Kodon 44 (-C) % 5.3, Kodon 5 (-CT) % 2.6, Kodon 22/23/24 (-AAGTTGG) % 2.6, Kodon 39 (-A) % 2.6 ve bilinmeyen % 15.8 olarak rapor edilmiştir (61).

Ayçiçek ve ark. Harran Üniversitesi Pediatri Hematoloji Bölümüne başvuran 115 (60 erkek, 55 kadın) BT' li hastayı çalışmalarına dahil etmişlerdir. β -globin StripAssay kiti ile mutasyonlar sıklık sırasına göre; IVS-I-110 (G->A) % 29.1, IVS-I-1 (G->A) % 13.9, Kodon 39 (C->T) % 10.4, Kodon 8 (-AA) % 9.1, IVS-I-5 (G->C) % 4.3, Kodon 5 (-CT) % 3.5, Kodon 44 (-C) % 3.5, IVS-I-130 (G->C) % 6.1, Kodon 8/9 (+G) % 3.0, IVS-I-6 (T->C) % 2.2, IVS-II-745 (C->G) % 1.7, IVS-2-848 (C->A) % 1.7, Kodon 6 (-A) % 0.9, Kodon 6 (G->A) % 0.4, Kodon 6 (A->T) % 0.4, bilinmeyen % 9.6 olarak rapor edilmiştir (62).

Genç ve ark. Adıyaman merkezli Ocak-Temmuz 2010 tarihleri arasında 1616 (813 erkek, 803 kadın) kişilik bir popülasyon çalışmasında, 28 BTT hastası tespit etmişlerdir. Mutasyonların tespitinde ARMS ve DNA dizi analizi yöntemini kullanmışlardır. Sıklık sırasına göre: IVS-I-1 (G->A) % 21.4, Kodon 17 (A->T) % 17.9, Kodon 8/9 (+G) % 10.7, Kodon 82/83 (-G) % 10.7, IVS-II-745 (C->G) % 10.7, IVS-I-110 (G->A) % 10.7, IVS-II-1 (G->A) % 7.1, Kodon 36/37 (-T) % 3.6, Kodon 44 (-C) % 3.6, Kodon 39 (C->T) % 3.6 olarak tespit edilmiştir (63).

Pehlivan ve ark.'nın Gaziantep'te 98 (52 erkek, 46 kadın) BT' li hastada, β -globin Strip Assay kiti ile tespit ettikleri mutasyonlar, sıklık sırasına göre: IVS-I-110 (G->A) % 29.1, IVS-II-1 (G->A) % 12.3, IVS-I-1 (G->A) % 7.7, Kodon 8(-AA) % 5.6, -30 (T->A) % 4.6, IVS-I-6 (T->C) % 4.6, Kodon 39 (C->T) 3.6, Kodon 44 (-C) % 3.1, IVS-II-745 (C->G) % 1.5, Kodon 8/9 (+G) % 2.1, Kodon 36/37 (-T) % 2.1, IVS-I-5 (G->C) % 2.1, Kodon 22/23/24 (-AAGTTGG) % 0.5, Kodon 5 (-CT) % 0.5 ve bilinmeyen % 20.9 olarak belirtilmiştir (64).

Güvenç ve ark. Adana - Seyhan Kalıtsal Kan Hastalıkları Merkezinde kayıtlı 3000 veriyi retrospektif olarak incelemiş ve 404 BTT tanısı almış hastalarda, β -globin StripAssay kiti ile tespit ettikleri mutasyonlar, sıklık sırasına göre: IVS-I-110 (G->A) % 35.14, Kodon 8 (-AA) % 9.15, IVS-I-1 (G->A) % 8.66, IVS-I-6 (T->C) % 7.67, -30 (T->A) % 7.42, IVS-II-1 (G->A) % 6.43, Kodon 39 (C->T) % 5.94, Kodon 44 (-C) % 4.95, IVS-I-5 (G>C) % 3.71, Kodon 5 (-CT) % 2.97, Kodon 8/9 (+G) % 2.47, IVS-II-745 (C->G) % 2.22, Kodon 22/23/24

(-AAGTTGG) % 0.99, -101 (C->T) % 0.74, Kodon 36/37 (-T) % 0.74, IVS-I-116 (T->G) % 0.25, Kodon 6 (-A) % 0.25, -88 (G->A) % 0.25 olarak saptanmıştır (65).

Çürük ve ark. Çukurova Bölgesinde BT ile ilgili yaptıkları çalışmada, yaygın bulunan mutasyonları ARMS yöntemini ile nadir (<% 1) bulunan mutasyonları ise DNA dizi analizi yöntemini ile saptamışlardır. Çalışmalarında 530 kromozom alleli incelenmiş olup, mutasyon sıklığına göre: IVS-I-110 (G->A) % 57.3, IVS-I-1 (G->A) % 8.3, Kodon 39 (C->T) % 6.4, IVS-I-6 (T->C) % 5.7, Kodon 8 (-AA) % 5.7, -30 (T->A) % 4.7, IVS-II-1 (G->A) % 3.4, IVS-II-745 (C->G) % 2.8, Kodon 5 (-CT) % 1.1, Kodon 44 (-C) % 0.7, Kodon 74/75 (-C) % 0.7, IVS-I-5 (G->C) % 0.7, Kodon 8/9 (+G) % 0.4, Kodon 36/37 (-T) % 0.4, Kodon 22/23/24 (-AAGTTGG) % 0.4, IVS-I-130 (G->C) % 0.4, IVS-I-5 (G->T) % 0.2, -28 (A->C) % 0.2, Kodon 15 (TGG->TGA) % 0.2, Kodon 82/83 (-G) % 0.2 olarak tespit edilmiştir (66).

Öney ve ark. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Talasemi Tanı, Tedavi ve Araştırma Ünitesinde 84 (36 erkek, 48 kadın) BTT hastasını incelemeye aldıkları çalışmada, mutasyonlar β -globin StripAssay kiti, ARMS (Allele refractory mutation system), REA (Restriction Enzyme Analyse) ve gerektiğinde DNA dizi analizi yöntemleri ile saptanmıştır. Sıklık sırasına göre: IVS-I-110 (G->A) % 34.9, Kodon 39 (C->T) % 12.8, IVS-II-745 (C->G) % 9.3, IVS-I-6 (T->C) % 9.3, IVS-I-1 (G->A) % 8.14, Kodon 5 (-CT) % 8.14, Kodon 8 (-AA) % 6.98, Kodon 44 (-C) % 5.81, IVS-II-1 (G->A) % 4.65 olarak tespit edilmiştir (58).

Yılmaz ve ark. Ege Üniversitesinde klinik olarak BT tanısı almış 35 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, mutasyonların tespiti için ARMS yöntemini kullanmışlardır. IVS-I-110 (G->A), IVS-I-1 (G->A), IVS-II-745 (C->G), IVS-I-6 (T->C) mutasyonlar kullanılarak ancak 24 hastada mutasyon tespit edilmiştir. 11 hastada ise hiçbir mutasyon rapor edilmemiş olup sıklık sırasına göre: IVS-I-110 (G->A) % 32.85, IVS-I-1 (G->A) % 7.14, IVS-I-6 (T->C) % 7.14, IVS-II-745 (C->G) % 4.28 ve bilinmeyen % 51.43 olarak saptanmıştır (67).

Çalışmamız Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Hematoloji Bölümünde takip ve tedavisi yapılan BT hastaları üzerinde yapıldı. Çalışma verilerimiz 30 BTM hastası ve 30 BTT' li ebeveyn olmak üzere toplam 90 hastadan oluşmaktadır. Mutasyonların analizi için, DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Sıklık sırasına göre:

IVS-I-110 (G->A) % 46.67, Kodon 8 (-AA) % 16.67, IVS-II-1 (G->A) % 11.67, Kodon 44 (-C) % 10.00, IVS-II-745 (C->G) % 5.00, IVS-I-1 (G->A) % 3.33, IVS-I-5 (G->T) % 3.33 ve -30 (T->A) % 3.33 olmak üzere toplam 8 çeşit mutasyon tespit edildi (Tablo 9-10). DNA dizi yöntemi, ilgili gen bölgesinin tümünü inceleme seçeneği sunduğu için mutasyonların tümünü tespit olanağı sağlar oysa ARMS, Strip, REA gibi yöntemler sınırlı sayıda mutasyon ve/veya baz inceleme seçeneği sunmaktadır. Bu nedenle hastalarımızın hepsinde mutasyonlar tespit edilebildi. DNA dizi analizi dışındaki yöntemlerle bulunamayan ve bilinmeyen mutasyonlar olarak rapor edilen mutasyonların, dizi analizi yöntemi ile saptanması yöntemin önemini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda en sık IVS-I-110 (G->A) mutasyonu görüldü (Tablo 9-10). Adıyaman merkezli çalışma hariç en sık IVS-I-110 (G->A) mutasyonu görülmüştür. Adıyaman' daki çalışmada birey sayının azlığı etkili olmuş olabilir. Tespit ettiğimiz mutasyonların sıklık sırası, Türkiye ortalamasıyla benzer görüldü (Tablo 10). Bu bağlamda verilerimizin oldukça heterojen olduğu söylenebilir. **Çalışmamızda** tespit edilen mutasyonların sıklığını sırasıyla; IVS-I-110 (G->A), Kodon 8 (-AA), IVS-II-1 (G->A), Kodon 44 (-C) oluşturdu. **İnce ve ark.**(60) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), Bilinmeyen, IVS-I-6 (T->C), Kodon 8 (-AA). **Gülbay ve ark.**(61) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), IVS-I-1 (G->A), bilinmeyen, IVS-II-1 (G->A), Kodon 8 (-AA), Kodon 8/9 (+G), Kodon 44 (-C). **Ayçiçek ve ark.**(62) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), IVS-I-1 (G->A), Kodon 39 (C->T), bilinmeyen, Kodon 8 (-AA). **Genç ve ark.**(63) çalışmalarında: IVS-I-1 (G->A), Kodon 17 (A->T), IVS-I-110 (G->A), IVS-II-745 (C->G), Kodon 8/9 (+G), Kodon 82/83 (-G). **Pehlivan ve ark.**(64) çalışmalarında: IVS-I-110(G->A), Bilinmeyen, IVS-II-1 (G->A), IVS-I-1 (G->A). **Güvenç ve ark.**(65) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), Kodon 8 (-AA), IVS-I-1 (G->A), IVS-I-6 (T->C). **Çürük ve ark.**(66) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), IVS-I-1 (G->A), Kodon 39 (C->T), IVS-I-6 (T->C), Kodon 8 (-AA). **Öney ve ark.**(58) çalışmalarında: IVS-I-110 (G->A), Kodon 39 (C->T), IVS-II-745 (C->G), IVS-I-6 (T->C), IVS-I-1 (G->A), Kodon 5 (-CT). **Yılmaz ve ark.**(67) çalışmalarında: Bilinmeyen, IVS-I-110 (G->A), IVS-I-1 (G->A), IVS-I-6 (T->C) mutasyon sıklığını tespit etmişlerdir. Gerek çalışmamız ve gerekse diğer bölgelerdeki çalışmalarda mutasyon sıklığı Türkiye' deki mutasyon sıklığıyla benzer olarak görüldü. Buna rağmen yöntem farklılığından

dolayı bilinmeyen mutasyonların tespit edilmesi ve çalışma verilerinin artırılması, bölgelerin mutasyon sıklığı ve çeşitliliğini saptama açısından önem taşımaktadır.

Tablo 10. Çalışmamız ve diğer çalışmalardaki mutasyon sıklığı.

MUTASYON	ÇALIŞMAMIZ	TÜRKİYE	MALATYA	ŞANLIURFA	DİYARBAKIR	ADİYAMAN	GAZİANTEP	ADANA-SEYHAN	ÇUKUROVA	ANTALYA	İZMİR
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
IVS-I-110(G->A)	46.67	39.7	47.4	29.1	27.8	10.7	29.1	35.14	57.3	34.9	32.85
Kodon 8 (-AA)	16.67	5.4	7.9	9.1	11.1	-	5.6	9.15	5.7	6.98	*
IVS-II-1 (G->A)	11.67	6.3	7.9	-	8.3	7.1	12.3	6.43	3.4	4.65	*
Kodon 44 (-C)	10.00	0.1	5.3	3.5	*	3.6	3.1	4.95	0.7	5.81	*
IVS-II-745 (C->G)	5.00	3.2	-	1.7	5.5	10.7	1.5	2.22	2.8	9.3	4.28
IVS-I-1 (G->A)	3.33	4.7	15.8	13.9	2.8	21.4	7.7	8.66	8.3	8.14	7.14
IVS-I-5 (G->T)	3.33	0.4	*	4.3	*	-	*	3.71	0.2	*	*
-30 (T->A)	3.33	3.1	-	-	*	-	4.6	7.42	4.7	*	*
Bilinmeyen	-	-	15.8	9.6	27.8	-	20.9	-	-	-	51.43
Allel sayısı	120	1017	44	230	72	28	196	404	530	84	70
Yöntem	3		2	2	1	1,3	2	2	1,3	1,2,3,5	1
Kaynaklar		(68)	(61)	(62)	(60)	(63)	(64)	(65)	(66)	(58)	(67)

1-ARMS 2-Strip Testi 3-DNA dizi 4- Reel time PCR 5- REA // * . Çalışılmamış, - . Yok

Türkiye, talaseminin en yaygın görüldüğü Akdeniz Ülkeleri arasında yer almaktadır. Ortadoğu Ülkeleri ile komşu olup Kuzey Afrika Ülkeleri ile tarihsel bir birlikteliği vardır. Türkiye ve diğer ülkelerde görülen mutasyon sıklığı Tablo 11’ de gösterilmiştir.

Tablo 11. Çalışmamız ve diğer ülkelerde görülen mutasyon sıklığı.

MUTASYON	ÇALIŞMAMIZ	TÜRKİYE	KIBRIS	YUNANITAN	BULGARİSTAN	İTALYA	SURİYE	IRAK	İRAN	AZERBAYCAN	FİLİSTİN	MISIR	TUNUS	CEZAYİR
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
IVS-I-110 (G->A)	46.6	39.7	78.4	42.5	27.3	23.5	24.0	1.2	6.5	11.9	17.6	28.5	20.0	24.7
Kodon 8 (-AA)	16.6	5.4	0.2	0.5	3.6	-	-	9.1	3.7	30.4	-	0.3	0.3	-
IVS-II-1 (G->A)	11.6	6.3	-	2.0	2.1	3.9	4.0	28.7	13.8	15.9	2.1	2.2	0.5	-
Kodon 44 (-C)	10.0	0.1	0.1	-	-	0.7	-	8.3	3.7	-	2.1	-	3.9	-
IVS-II-745(C->G)	5.0	3.2	5.7	4.8	8.2	-	1.0	0.4	3.7	0.8	2.1	3.7	3.1	0.7
IVS-I-1 (G->A)	3.3	4.7	6.0	13.4	4.1	10.4	-	17.7	0.9	1.9	-	15.1	3.9	10.5
IVS-I-5 (G->T)	3.3	0.4	-	-	-	-	-	2.4	7.4	1.6	2.1	-	0.9	0.3
-30 (T->A)	3.3	3.1	-	0.1	-	-	7.0	-	-	1.1	2.1	1.5	1.2	0.3
Allel sayısı	120	937	1017	1142	194	893	164	127	108	377	296	942	473	305
Kaynaklar		(68)	(68)	(68)	(68)	(68)	(68)	(69)	(68)	(68)	(68)	(68)	(68)	(68)

- Yok

IVS I-110 (G->A) en yüksek oranda Kıbrıs' ta rapor edilmiş ve Akdeniz Ülkeleri ve Kuzey Afrika Ülkelerinde sıklıkla görülmektedir. Türkiye' nin doğu ve güneydoğusuna komşu ülkelerde; IVS-II-1 (G->A) ve IVS I-110 (G->A) belirgin sıklıkla gözlemlendiği görülmektedir. Kodon 8 (-AA) delesyonu Türkiye'nin doğusunda olmak üzere belirgin sıklıkta Azerbaycan' da rapor edilmiştir. Çalışmamızdaki mutasyonları yüksek sıklıkta sırasıyla: IVS-I-110 (G->A), Kodon 8 (-AA), IVS-II-1 (G->A), Kodon 44 (-C) oluştururken; Akdeniz Ülkelerinde IVS I-110 (G->A), IVS I-1 (G->A), IVS II-745 (C->G) ve IVS-II-1 (G->A) oluşturmaktadır. Türkiye' nin doğu ve güneydoğusuna komşu ülkelerde: IVS I-110(G->A) \approx IVS-II-1 (G->A), Kodon 8 (-AA) ve IVS I-1 (G->A) ve IVS-I-5 (G->T) mutasyonların sıklığı gözlenirken; Kuzey Afrika Ülkelerinde IVS I-110 (G->A), IVS I-1 (G->A), IVS II-745 (C->G) mutasyonlarının sıklığı tespit edilmiştir.

Genetik polimorfizmlerden tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) toplumda %1' den fazla sıklıkta görülen yaygın çeşitleri vardır. SNP'ler aa dizisini değiştirebilir veya tamamen sessiz olabilirler. Polimorfizmin bazıları hastalık riskini artırırken, bazıları azaltabilmekte, bazı polimorfizmler ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedirler (70,71). Çalışmamızda mutasyonlarla birlikte 4 çeşit SNP tespit edilmiş olup, hastaların eritrosit

süspansiyon transfüzyonu almaları nedeniyle bu mutasyonların hastalığın kliniğini nasıl etkilediği değerlendirilemedi (Tablo 6) (Tablo 8). BTT' li bireylerin çoğunda mutasyonlarla birlikte birden fazla SNP görüldü. Kliğine etkisini değerlendirmek için SNP' ler ayrı ayrı sınıflandırılmadığından istatistiksel değerlendirme yapılamadı (Tablo 8).

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda 30 BTM' li hasta ve 30 BTT' li ebeveynde, mutasyonların tespiti DNA dizi analizi yöntemiyle yapıldı.
2. Çalışmada 8 çeşit mutasyon görüldü. En sık görülen mutasyon IVS-I-110 (G->A) % 46.67 olup bunu Kodon 8 (-AA) % 16.67, IVS-II-1 (G->A) % 11.67, Kodon 44 (-C) % 10.00, IVS-II-745 (C->G) % 5.00, IVS-I-1 (G->A) % 3.33, IVS-I-5 (G->T) % 3.33 ve -30 (T->A) % 3.33 takip ettiği saptanmıştır.
3. Tespit edilen mutasyonların % 80' den fazlasını; IVS-I-110 (G->A) % 46.43, Kodon 8 (-AA) % 17.86, IVS-II-1 (G->A) % 12.50, Kodon 44 (-C) % 10.71 oluşturdu. Mutasyon sıklığı açısından, Türkiye geneline benzer bir dağılım tespit edildi.
4. Mutasyonlarla birlikte; Kodon 2 (T->C), IVS-II-16 (G->C), IVS-II-666 (C->T) ve c.-31 (C->T) olmak üzere 4 çeşit SNP tespit edildi.
5. BTT' li hastaların hematolojik analizlerinde; **erkeklerde:** RBC 6.33 ± 0.74 M/uL, Hb 13.49 ± 1.15 g/dL, Hct % 40.09 ± 2.98 , MCV 63.81 ± 5.74 fL, MCH 21.42 ± 1.49 pg, MCHC % 33.65 ± 1.18 , RDW % 18.63 ± 1.48 ve **kadınlarda:** RBC 5.41 ± 0.45 M/uL, Hb 11.24 ± 1.04 g/dL, Hct % 33.86 ± 3.08 , MCV 62.59 ± 3.57 fL, MCH 20.77 ± 1.29 pg, MCHC % 33.18 ± 1.28 , RDW % 18.21 ± 1.95 olarak tespit edildi. BTT' li bireylerde görülen hemogram değerleriyle benzer sonuçlar görüldü.
6. BTT hastalarında Hb varyant düzeyleri **erkeklerde:** HbA % 91.85 ± 7.44 , HbF % 2.83 ± 7.54 , HbA2 % 5.33 ± 0.52 ve **kadınlarda:** HbA % 91.97 ± 6.66 , HbF % 3.01 ± 6.46 , HbA2 % 5.02 ± 0.79 olarak tespit edildi. BTT' li bireylerde görülen Hb varyant değerleriyle benzer sonuçlar görüldü.
7. BTM hastaları düzenli eritrosit süspansiyon trasfüzyonu almaları nedeniyle hemogram ve Hb varyant düzeyleri BTM' li hastalarda görülen laboratuvar verileri ile uyumlu değildi. Fakat BTM' li hastalarda görülen ortalama Hb 9.20 ± 1.32 g/dL düzeyi; takip - tedavilerinin etkin sürdürüldüğü düşündürmektedir.
8. Bu çalışma DNA dizi analizi yönteminin kullanımına bağlı olarak Diyarbakır'da saptanamayan mutasyonların belirlenme oranı artırmıştır. Buna bağlı olarak

yüksek kapasiteli çok merkezli koordine bir çalışma ile bu mutasyonların ve bunların hastalığa etkisinin belirlenmesini geliştirecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Ed: Wintrobe's Clinical Hematology. pp. 1084-1131, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2009.
2. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005;90(5):649–60.
3. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:11.
4. <http://www.worldometers.info/> erişim tarihi: 08.11.2013.
5. Tadmouri GO, Başak AN. Beta-thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin*. 2001;25(2):227–39.
6. <http://globin.bx.psu.edu/> erişim tarihi: 08.11.2013.
7. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61–76.
8. <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp/> erişim tarihi: 08.11.2013.
9. Çürük MA. Hemoglobinopatiler ve klinik açıdan önem taşıyan hemoglobin varyantları ve kombinasyonları; ülkemizde sık görülen hemoglobinopatiler. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Kongresi Bildiri Kitabı, s.3-11. Uluslararası Katılımlı Kongre Lab&Expo, Antalya, 24-28 Eylül 2013.
10. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(1):11–25.
11. Tuzmen S, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. *Blood Rev*. 2001;15(1):19–29.
12. Altay Ç. The frequency and distribution pattern of β -thalassemia mutations in Turkey. *Turk J Haematol*. 2002;19(2):309–15.
13. Tadmouri GO, Tüzmen S, Özçelik H, Ozer A, Baig SM, Senga EB, et al. Molecular and population genetic analyses of beta-thalassemia in Turkey. *Am J Hematol*. 1998;57(3):215–20.

14. Başak AN. Talasemi Moleküler Genetiği. s. 99-106. Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, Mersin, 2005.
15. Kennelly PJ, Rodwell VW. Proteins: Myoglobin & hemoglobin. Ed. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. pp. 43-50, Harper's Illustrated Biochemistry, The McGraw-Hill Companies, China, 2009.
16. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. 3. Baskıdan Çeviri Ed: Ulukaya E. s. 25-42, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 2007.
17. Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2004;1-13.
18. Ho PJ, Thein SL. Gene regulation and deregulation: a beta globin perspective. Blood Rev. 2000;14(2):78-93.
19. Huisman TH. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. Baillières Clin Haematol. 1993;6(1):1-30.
20. <http://themedicalbiochemistrypage.org/hemoglobin> erişim tarihi: 17.01.2014.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>, erişim tarihi: 13.11.2013.
22. Weatherall D. The thalassemias. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, Williams Hematology. pp. 547-580, McGraw-Hill Companies, USA, 2001.
23. Weatherall D. The Thalassemias: The Role of Molecular Genetics in an Evolving Global Health Problem. Am J Hum Genet. 2004;74(3):385-92.
24. Higgins T, Eckfeldt JH, Barton JC, Dumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. Ed: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. pp. 985-1030, Elsevier Saunders, USA, 2012.
25. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. Lancet. 2012;379(9813):373-83.
26. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haematol. 2004;26(3):159-76.

27. Muncie HL Jr, Campbell J. Alpha and beta thalassemia. *Am Fam Physician*. 2009;80(4):339–44.
28. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704–12.
29. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8):1284–90.
30. Plant KE, Routledge SJ, Proudfoot NJ. Intergenic transcription in the human beta-globin gene cluster. *Mol Cell Biol*. 2001;21(19):6507–14.
31. Vichinsky EP. Alpha thalassemia major--new mutations, intrauterine management, and outcomes. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;35–41.
32. Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of beta-thalassemia. *Blood*. 1988;72(4):1107–16.
33. Rosatelli MC, Dozy A, Faà V, Meloni A, Sardu R, Saba L, et al. Molecular characterization of beta-thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hum Genet*. 1992;50(2):422–6.
34. Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ. Advances in thalassemia research. *Blood*. 1984;63(4):738–58.
35. Forget BG, Olivieri NF. Hemoglobin synthesis and the Thalassemias. Ed. Handin RI, Lux SE, Stossel TP, *Blood : Principles and practice of hematology*. pp. 1503-1596, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2003.
36. Weatherall DJ. Pathophysiology of thalassaemia. *Baillières Clin Haematol*. 1998;11(1):127–46.
37. Hardison R, Riemer C, Chui DH, Huisman TH, Miller W. Electronic access to sequence alignments, experimental results, and human mutations as an aid to studying globin gene regulation. *Genomics*. 1998;47(3):429–37.
38. Van der Weyden MB, Fong H, Hallam LJ, Harrison C. Red cell ferritin and iron overload in heterozygous beta-thalassemia. *Am J Hematol*. 1989;30(4):201–5.
39. Eldor A, Rachmilewitz EA. The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*. 2002;99(1):36–43.

40. Borgna-Pignatti C, Vergine G, Lombardo T, Cappellini MD, Cianciulli P, Maggio A, et al. Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes. *Br J Haematol.* 2004;124(1):114–7.
41. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, et al. Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:40–7.
42. Galanello R, Melis MA, Ruggeri R, Addis M, Scalas MT, Maccioni L, et al. Beta 0 thalassemia trait in Sardinia. *Hemoglobin.* 1979;3(1):33–46.
43. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem.* 2003;49(5):769–76.
44. Huisman THJ. High-Performance Liquid Chromatography as a Method to Identify Haemoglobin Abnormalities. *Acta Haematol.* 1987;78(2-3):123–6.
45. Hortin GL, Goldberger BA. Chromatography and Extraction. Ed: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. pp. 307-328, Elsevier Saunders, USA, 2012.
46. Gulia SK, Singh B, Wilson JP. A simplified, cost- and time-effective procedure for genotyping pearl millet in resource-limited laboratories. *Afr J Biotechnol.* 2010;9(20):2851–9.
47. Shazia Q, Mohammad ZH, Rahman T, Shekhar HU. Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients: A Review of the Literature. *Anemia.* 2012 May 9;2012.
48. Urrechaga E, Aguirre U, Izquierdo S. Multivariable Discriminant Analysis for the Differential Diagnosis of Microcytic. *Anemia.* 2013 Sep 4;2013.
49. Kainimoghaddam Z, Valaei A, Bayat F, Taghavi Basmanj M, Navabmoghaddam F, Mortezaazadeh M, et al. Prenatal Diagnosis of β -thalassemia in Twin Pregnancies in Iran. *Arch Iran Med.* 2013;16(10):573–5.
50. Kızıler AR, Aydemir B, Kurtoğlu E, Uğur A. Beta Talasemi Minörlü Hastalarda Eser Element ve Oksidatif Hasar ilişkisi. *Fırat Tıp Derg.* 2009;14(1):28–32.

51. Oguz F, Uzunhan FA, Binnetođlu FK, Vehid HE. Hipokrom Mikrositer Anemide Demir Eksikliği Anemisi ve Talasemi Taşıyıcılığı Oranları. *Çocuk Dergisi*. 2009;9(3):116–22.
52. Rahim F, Keikhaei B. Better differential diagnosis of iron deficiency anemia from beta-thalassemia trait. *Turk J Hematol*. 2009;26(3):138–45.
53. Eryılmaz N. Hatay İlinde Beta Talasemi Mutasyonları Dağılımının DNA Dizi Analizi Yöntemiyle Araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Hatay, 2012.
54. Gerçik F. Van İli Çevresinde Beta Talasemi Taşıyıcı Sıklığı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, 2006.
55. Şimşek F, Öztürk G, Kemahlı S, Erbaş D, Hasanođlu A. Oxidant and antioxidant status in beta thalassemia major patients. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005;58:34-38.
56. Balcı YI, Akın M, Acun A. Beta-Talasemi Major Hastalarında Plasma Vitamin B12 Ve Folik Asit Düzeyleri. *Türkiye Çocuk Hast Derg*. 2010;4(1):18–21.
57. Yapıcı G, Aksöz FT, Kızılok A. Frequency of carriers for beta thalassemia and sickle cell trait in Mersin. *Anatol J Clin Invest*. 2007;1:255–9.
58. Öney S, Öztürk Z, Küpesiz A, Keser İ, Yeşilipek MA. Beta-Talasemi Taşıyıcılarında Beta-Globin Gen Mutasyon Tipi ve Hematolojik Fenotip Arasındaki İlişki. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi*. 2008;2(4):23–8.
59. Hazan F, Dursun G, İtirlı G, Yalaza C, Onay H, Akercan F, et al. Beta talasemi major prenatal tanı analizi yapılan üçüz olgu. *Ege Tıp Dergisi*. 2013;52(1):45–8.
60. Ince HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Muftuođlu E. Molecular Basis of b-Thalassemia Mutations in Diyarbakir in the Southeastern Region of Turkey. *Hemoglobin*. 2003;27(4):275–8.
61. Gülbay G, Yeşilada E, Aydođdu İ, Özgen Ü, Otlı G. Malatya’da Beta-Talasemi Mutasyonları. *J Inonu Univ Med Fac*. 2010;16(4):209–12.
62. Ayçiçek A, Koç A, Özdemir ZC, Bilinç H, Koçyiđit A, Dilmeç F. Beta-globin gene mutations in children with beta-thalassemia major from Şanlıurfa province, Turkey. *Turk J Hematol*. 2011;28:264–8.

63. Genc A, Tastemir Korkmaz D, Buyukleyla M, Celiker M. Prevalence and molecular analysis of β -thalassemia in Adiyaman, Turkey. *Hemoglobin*. 2012;36(2):131–8.
64. Pehlivan S, Okan V, Guler E, Yilmaz M, Sever T, Dikensoy E, et al. Thalassemia mutations in Gaziantep, Turkey. *Afr J Biotechnol*. 2010;9(8):1255–8.
65. Guvenc B, Canataroglu A, Unsal C, Yildiz SM, Turhan FT, Bozdogan ST, et al. β -Thalassemia mutations and hemoglobinopathies in Adana, Turkey: results from a single center study. *Arch Med Sci AMS*. 2012;8(3):411–4.
66. Cürük MA, Arpacı A, Attila G, Tuli A, Kiliç Y, Aksoy K, et al. Genetic heterogeneity of beta-thalassemia at Cukurova in southern Turkey. *Hemoglobin*. 2001;25(2):241–5.
67. Yılmaz B, Balım Z, Özkınay F, Gündüz C, Altıntaş N, Aydınok Y, Topçuoğlu N. Beta talasemi mutasyon tiplerinin moleküler analizi. *Ege Tıp Dergisi*. 2000;39(3):153–157.
68. Old J, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, Harteveld CL, Petrou M, Traeger-Synodinos J. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. Thalassaemia International Federation Publishers No. 18, Team up Creations Ltd, Nicosia, Cyprus, 2013.
69. Al-Allawi NAS, Hassan KMA, Sheikha AK, Nerweiy FF, Dawood RS, Jubrael J. β -Thalassemia Mutations among Transfusion-Dependent Thalassemia Major Patients in Northern Iraq. *Mol Biol Int*. 2010;2010.
70. Schröder NWJ, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(3):156–64.
71. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal*. 2008;21(3):282-295.

