



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

**AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDE YAŞAYAN
ALFA TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA
MUTASYON ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. DERVİŞ GÖKDOĞAN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya ARAL

AYDIN-2015

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

**AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDE YAŞAYAN
ALFA TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA
MUTASYON ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. DERVİŞ GÖKDOĞAN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya ARAL

AYDIN-2015

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan, tezimin planlanması ve yürütülmesinde değerli destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışmanım, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya ARAL'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince çok kıymetli bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım üzerimde emekleri olan hocalarım sayın Prof. Dr. Münevver Kaynak TÜRKMEN'e, Prof. Dr. Ayşe YENİGÜN'e, Prof. Dr. Ferah SÖNMEZ'e, Prof. Dr. Ayşe Fahriye TOSUN'a, Doç. Dr. R. Emre ÇEÇEN'e, Doç. Dr. Duygu ERGE'ye, Yrd. Doç. Dr. Tolga ÜNÜVAR'a, Yrd. Doç. Dr. Yasin BULUT'a, Yrd. Doç. Dr. A. Barış AKCAN'a, Yrd. Doç. Dr. Mediha AKCAN'a, Yrd. Doç. Dr. Semiha TERLEMEZ'e, Yrd. Doç. Dr. Dilek YILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Yavuz TOKGÖZ'e, Yrd. Doç. Dr. Pınar UYSAL'a, Uzm. Dr. Faruk DEMİR'e, Uzm. Dr. Özgür CARTI'ya ve Uzm. Dr. Ahmet ANIK'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez planlama ve hazırlama aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan değerli hocam sayın Prof. Dr. Gökay Bozkurt'a ve değerli ekibine teşekkür ederim.

Tezin istatistiksel değerlendirmesinde emeği geçen İstatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. İmran KURT ÖMÜRLÜ'ye Arş. Gör. Merve CENGİZ'e teşekkür ederim.

Varlıklarıyla bana yaşama ve çalışma azmi veren anne ve babama teşekkür ederim

Bu tezi uzmanlık eğitimim boyunca kendilerine zaman ayıramadığım, varlıklarıyla yaşama sebebim olan kızlarım; ilk gözağrım **Rümeysa BEREN**'ime ve son beşiğim **Fatma ZEHRA**'ma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİ.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
EKLER DİZİNİ.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	iv
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
1.Hemoglobin	2
2.Talasemi.....	4
2.1.Tanım.....	4
2.2.Dünya’da Alfa Talasemi Epidemiyolojisi.....	4
2.3.Türkiye’de Alfa Talasemi Epidemiyolojisi.....	5
2.4.Alfa Talasemide Genetik.....	5
2.5.Alfa Talasemi Kliniği	7
2.6.Fizyopatoloji.....	9
2.7.Alfa Talasemide Tanı.....	9
2.8.Prenatal Tanı.....	10
3. Hemoglobinopatilerde Moleküler Tanı Yöntemleri.....	11
3.1.Direkt mutasyon tayini yapan yöntemler.....	11
3.2.İndirekt yöntemler.....	11
3.3.Allel Spesifik Olgonükleotid Hibridizasyon.....	12
3.4.DNA Dizi Analizi.....	12
GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	13
BULGULAR	19
TARTIŞMA.....	26
SONUÇLAR	36
ÖZET	38
İNGİLİZCE ÖZET.....	40
KAYNAKLAR.....	42
EKLER	47

TABLolar DİZİNİ

Tablo I. ViennaLab α -globin StripAssay ile değerdendirilen mutasyonlar.

Tablo II. HBA1 ve HBA2 genlerinin PCR yöntemiyle ayrı ayrı çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri.

Tablo III. HBA1 ve HBA2 genlerinin DNA dizileme reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.

Tablo IV. Alfa talasemilerin genotip dağılımı ve sıklığı.

Tablo V. Alfa talasemi mutasyonlarının allel dağılım ve sıklığı.

Tablo VI. Mutasyon genotipine göre ortalama hemoglobin, kırmızı küre, MCV, MCH ve RDW değerdeleri.

Tablo VII. Tek ve çift gen delesyonu olan hastaların ortalama Hb, RBC, MCV, MCH, RDW ve HbA2 düzeyleri.

Tablo VIII. Genotip dağılımına göre alfa talasemi taşıyıcılarında Hb, MCV, MCH, RBC ve RDW durumu.

Tablo IX. Çalışmamızda ve literatürde $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip bireylerdeki hematolojik parametreler.

Tablo X. Çalışmamızda ve literatürde $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ genotipine sahip bireylerdeki hematolojik parametreler.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hemoglobinin yapısı.

Şekil 2. Hemoglobin yapımı.

Şekil 3. Alfa ve beta globin gen aile yapısı ve globin genlerinin zamansal gelişim süreci.

Şekil 4. Talaseminin coğrafik dağılımı.

Şekil 5. Düzenleyici bölge (MCS-R) delesyonları.

Şekil 6. Alfa globin gene kümesi. α^0 (A) ve α^+ (B) talasemiye neden olan delesyonlar.

Şekil 7. Hb H hastalığında HPLC patterni

Şekil 8. Farklı alfa talasemi genotiplerine Hb A2 düzeyi.

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Etik kurul onayı

SİMGELER ve KISALTMALAR

Hb	: Hemoglobin
RBC	: Kırmızı küre
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
RDW	: Eritrosit dağılım genişliği
α	: Alfa
β	: Beta
$-\alpha^{3,7}$	: 3.7 kb gen delesyonu
$--^{20,5}$	: 20.5 kb çift gen delesyonu
$--^{MED}$	: MED çift gen delesyonu
$\alpha 2^{PolyA-1}$	: Alfa 2 poliadenil A-1 nokta mutasyonu
$-\alpha^{4,2}$	: Alfa 4.2 kb gen delesyonu
$\alpha 2^{IVS1(-5nt)}$	: Alfa IVS-1 (-5nt) nokta mutasyonu
$\alpha 2^{PolyA-2}$	: Alfa 2 poliadenil A-2 nokta mutasyonu
$\alpha\alpha^{anti-3.7}$	: Alfa gen triplikasyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
HPLC	:Yüksek performanslı likit kromatografisi

GİRİŞ ve AMAÇ

Alfa talasemi klinik bulgu vermeyen sessiz taşıyıcılardan, anne karnında ölüme yol açan ağır kansızlık şeklinde çok değişken bulgularla seyreden, alfa globin zincirleri sentezinin azalması veya yokluğu ile karakterize kalıtsal bir kan hastalığıdır. Çok sayıdaki alfa globin gen allellerinin değişik kombinasyonları çok çeşitli hematolojik ve klinik fenotipe yol açmaktadır. Bir veya 2 gen delesyonu ile oluşan taşıyıcılar herhangi bir tedavi gerektirmezler. Hafif-orta derecede hemolitik anemi görülen Hb H hastaları da genelde klinik olarak iyidirler. Bazı Hb H hastaları ise aralıklı veya düzenli olarak transfüzyon ihtiyacı duyarlar. Hb Bart's hidrops fetalis sendromu anne karnında ya da doğar doğmaz transfüzyon yapılmazsa ölümcüldür (1).

Tek gen mutasyonları klinik ve hematolojik olarak normal olduklarından moleküler çalışma olmaksızın tanınamazlar. Ağır taşıyıcılar açıklanamayan hipokrom mikrositer anemi olarak başvurabilirler. Bu kişilerde yapılan testlerle demir eksikliği, beta talasemi taşıyıcılığı ve kronik hastalık anemisi dışlanmışsa moleküler testlerle alfa talasemi ayırıcı tanısı yapılır (1).

Genotip ve fenotip ilişkisinin bilinmesi uygun tanı konabilmesi, erken yaştan itibaren uygun tedavi programının planlanabilmesi, uygun tıbbi bakım ve desteğin sağlanabilmesi, prognoz tayini ve genetik danışma için yeni bilgiler sağlaması açısından önemli ve yararlıdır (2)

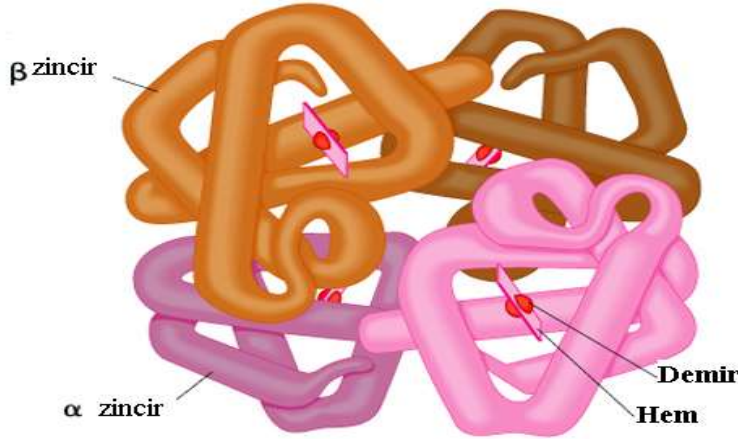
Bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde yaşayan alfa talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan çocuklarda mutasyon tipini belirlemeyi ve saptanan mutasyonların hematolojik parametreler üzerine olan etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1. HEMOGLOBİN

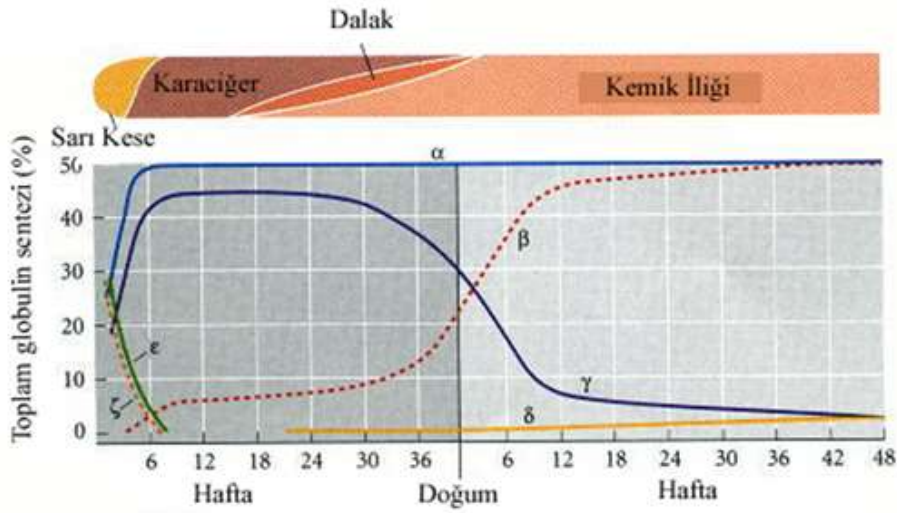
Hemoglobin (Hb), demir atomu içeren protoporfirin halkası (hem) ve buna kovalen bağlarla bağlanmış 4 globin zincirinden oluşan bir tetramerdir. Her bir globine bir hem eşlik etmektedir (Şekil 1). Hem'in yapısında bulunan ferröz demir atomları oksijene bağlanır ve transportunda görev alır. Hem'in yapısındaki ferroz iyonu histidinin N ucuna bağlıdır. Porfirin halkası ise bulunduğu cebe, yapısındaki fenilalanin aracılığı ile oturur. Her heme grubunda oksijen ferröz demire geri dönüşümlü olarak bağlanır (1,3,4)

Alfa globin zincirleri 141, β globin zincirleri 146 aminoasitten oluşmaktadır. Bütün globin genleri bazı ortak yapısal özelliklere sahiptir. Üç kodlayıcı bölge (ekzon) ve aralarında iki kodlayıcı olmayan bölgeden (intron) oluşur (4).



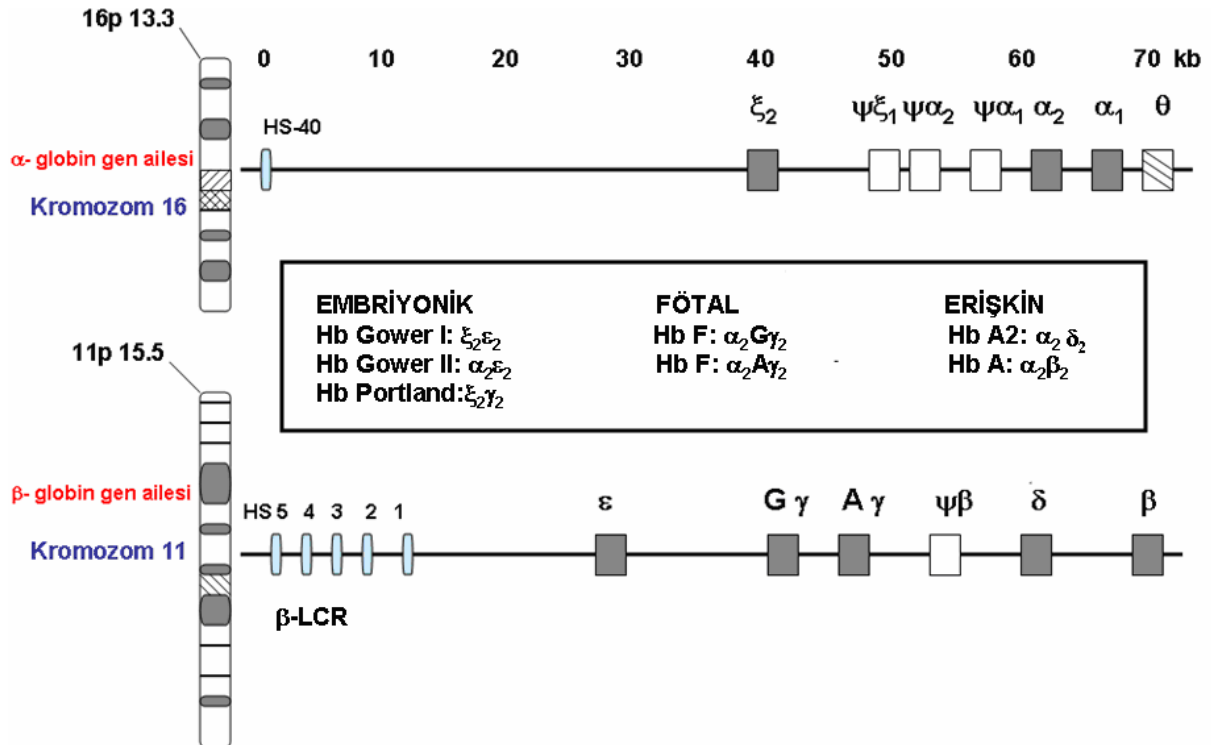
Şekil 1. Hemoglobinin yapısı.

Globin zincirinin yapısı insan yaşamının değişik dönemlerinde gelişimsel farklılıklar gösterir. İntrauterin hayatın ilk 8 haftasında üretilen hemoglobine embriyonel hemoglobinler [Gower-1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Gower-2 ($\alpha 2\epsilon 2$) ve Portland ($\zeta 2\gamma 2$)] denir. İntrauterin hayatın 9. haftasından sonra ise baskın Hb fetal hemoglobin [Hgb F ($\alpha 2\gamma 2$)]'dir. Embriyonik Hb'ler yenidoğan dönemi ve sonrasında bulunmazlar. Doğumdan sonra Hb F miktarı giderek azalır ve 1 yaşından sonra %2'nin altına iner. Erişkin hemoglobini [Hb A ($\alpha 2\beta 2$)] gestasyonel hayatın 1. ayından sonra görülmeye başlar ve doğumda toplam hemoglobinin %30'unu, doğumdan 2 ay sonra %50'sini ve 6. aydan sonra yaklaşık %95'ini oluşturur. Hb A2 ($\alpha 2\delta 2$) doğumdan hemen sonra görülmeye başlar ve %1,5-3,5 gibi düşük seviyede hayat boyu devam eder (Şekil 2). Erişkinlerde hemoglobinin %95'ini HbA, %2-3'ünü Hb A2 ve %1'den azını Hb F oluşturur (1).



Şekil 2. Hemoglobin yapımı.

İnsan α -gen ailesi dört işlevsel gen (ζ , α_2 , α_1 , θ), üç etkin olmaya gen (psödogen, $\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$) içermektedir. İnsan β -gen ailesi ise, beş etkin gen (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β) ve bir etkin olmayan genden (psödogen, $\psi\beta$) oluşmaktadır. Fötal Hb, heterojen bir yapıya sahip olup iki farklı γ -globin zincirinden meydana gelmektedir. Gama globin zincirinin 136. pozisyonunda, glisin amino asit bileşimi (GGA) yer alıyorsa G, alanin (GCA) yer alıyorsa A globin zinciri oluşmaktadır (Şekil 3) (4).



Şekil 3. Alfa ve beta globin gen aile yapısı ve globin genlerinin zamansal gelişim süreci.

2. TALASEMİ

2.1.Tanım

Talasemi Hb molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin ya da daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize sıklıkla otozomal resesif nadiren de otozomal dominant geçişli kalıtsal bir hastalıktır. İlk defa 1925 yılında Thomas Cooley ve Peart Lee isimli arştırmacılar tarafından İtalyan kökenli çocuklarda tarif edilmiştir. İlk olguların çoğu Akdeniz kökenli çocuklar olduğu için hastalık daha sonra Yunanca'da “deniz” demek olan thalassa'dan yola çıkılarak talasemi olarak adlandırılmıştır Beta zincir sentezi azlığı veya yokluğunda beta talasemi, alfa globin zincir sentezi azlığı veya yokluğunda alfa talasemi ortaya çıkar (5,6).

2.2. Dünyada Alfa Talasemi Epidemiyolojisi

Hemoglobinde kalıtsal mutasyonlar insanda en sık rastlanan tek gen bozukluklarıdır. Alfa talasemi diğer hemoglobinoopatilerde olduğu gibi sıtmanın endemik olduğu olduğu tropik ve subtropik bölgelerden köken almaktadır ve bu bölgelerde sık görülmektedir (Şekil 4) (1,7).



Şekil 4. Talaseminin coğrafik dağılımı.

Son 50 yılda hemoglobinoopatilerin dağılımında giderek artan değişiklikler olmuştur. (8). Bu artışın birinci nedeni, endemik bölgeden göçler nedeniyle hemoglobinoopatilerin tüm dünyada görülmeye başlamasıdır. İkinci neden çoğu göçmen nüfusunun genç olmasıdır. Bu nedenle bu riskli popülasyonda gebelik oranı artmaktadır. Üçüncü neden ise göç alan gelişmiş ülkelerde doğum oranının azalmasına karşın, bazı göçmen gruplarında hasta doğum prevalansının yüksekliğidir (9). Nüfus sayımı verilerine göre, son 3 yılda Akdeniz bölgesinden göçte azalma, Asya'dan yapılan göçte ise %2000 artış olduğunu göstermektedir (10).

Alfa talasemi allel sıklığı Akdeniz bölgesinde %5-10, Batı Afrika'da %20-30, Suudi Arabistan, Hindistan, Tayland, Papua Yeni Gine ve Malezya'da %60-80 kadar çoktur. Çinlilerde heterozigot taşıyıcılık sıklığı %5-15 olarak rapor edilmiştir. İngiltere, İzlanda ve Japonya'da ise alfa talasemi sıklığı %0.01'den az görülmektedir. Alfa talasemi sıklığı zencilerde de yüksektir. Amerika'lı zencilerde %15 sessiz taşıyıcı, %3 ağır alfa talasemi taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Güneydoğu Asya'da çok görülen Hb Constant Spring nedeniyle HbH fenotipi görülebilir (9).

Kuzey Amerika Talasemi Araştırma Ağı verilerine göre alfa talasemili hastaların %85'i Asya'lı, %4'ü beyaz, %11'i Afrika'lı, zenci ve karışık etnik kökenlidir. Hastaların %59'u HbH olup, tek bir alfa globin genine sahiptir ($-\alpha/--$), %8'inde alfa globin geni bulunmaz ($--/--$), %33'ünde ise yapısal mutasyonlara bağlı gen delesyonları vardır (11).

2.3.Türkiye'de Alfa Talasemi Epidemiyolojisi

Alfa-talasemi sıklığını Arcasoy ve ark. (12), ülke genelinde %0.25, Canatan ve ark. (13,14). Antalya'da %2.5- 6.5, Kılınç ve ark. ile Güvenç ve ark. (15,16) Adana'da yapılan taramalarda %2.9-7.5, Özsoylu ve ark. (17,18) Ankara'da kordon kanında, gen haritalama yöntemiyle %3.6, kromatografik yöntemle %4.1 olarak tespit etmişlerdir.

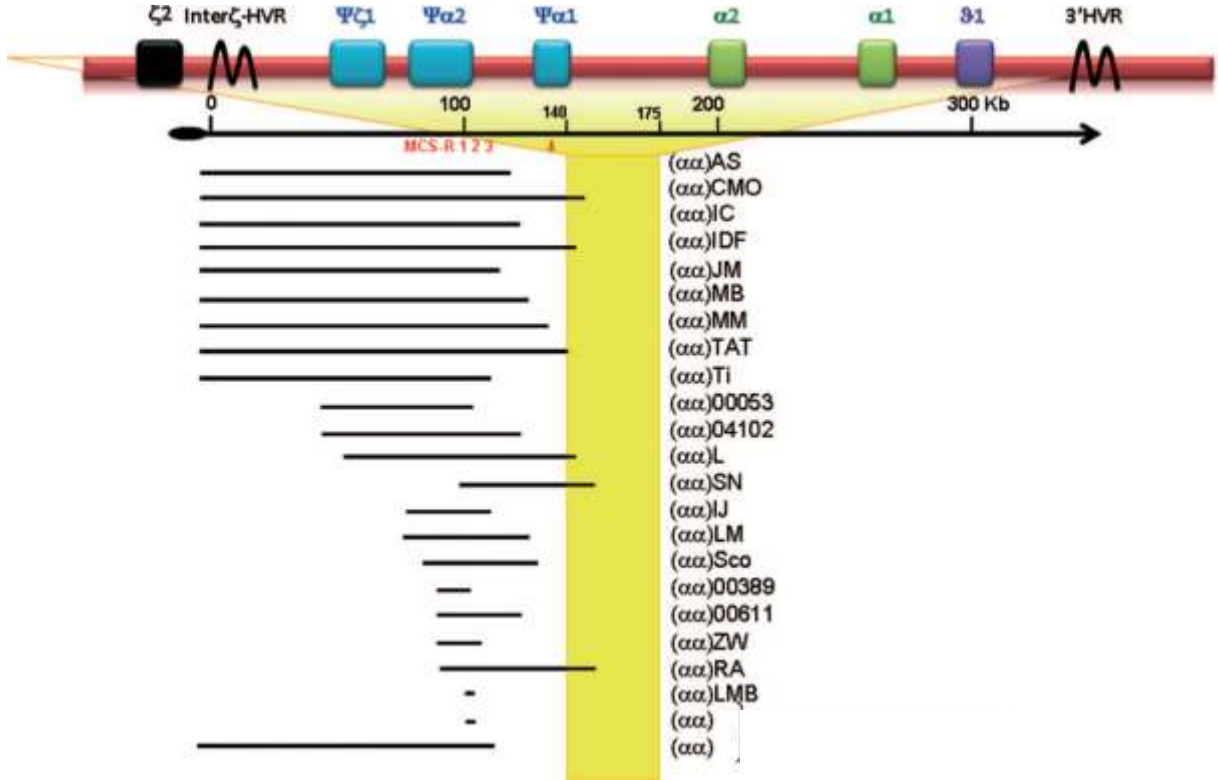
Alfa talasemi mutasyon çalışmalarında yöresel farklılıklar olmakla birlikte en sık $\alpha 3.7$ (%5,5-52,2) delesyonu görülmekte, onu sırasıyla 20,5 (%0,5-22), 4,2 (%0,5-12), MED (%9,5-27,7, FİL (%0,5-3,2) delesyonları ve delesyonel olmayan mutasyonlar poliA-2 (%1,4-10), alfa1-5nt (%4-8), poliA-1 (%0,5-9), Hb Koya Dora (%1,8-5,5), Hb Adana (%1,9) izlemektedir. Alfa triplikasyonu ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$; %1,1-55) da nadir olmayarak saptanmıştır (1).

2.4.Alfa Talasemide Genetik

Alfa talasemi, globinin α zincirlerini kodlayan genlerdeki delesyonlar veya diğer tipteki mutasyonlar sonucu zincirin yetersiz sentezi sonucu meydana gelir. α globin zincirleri her iki 16. kromozom üzerinde bulunan 2'şer genden ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$), toplam 4 gen tarafından kodlanır ve normal genotip, $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ olarak yazılır (4)

Alfa globin geni mutasyonları 3 ana grupta toplanır:

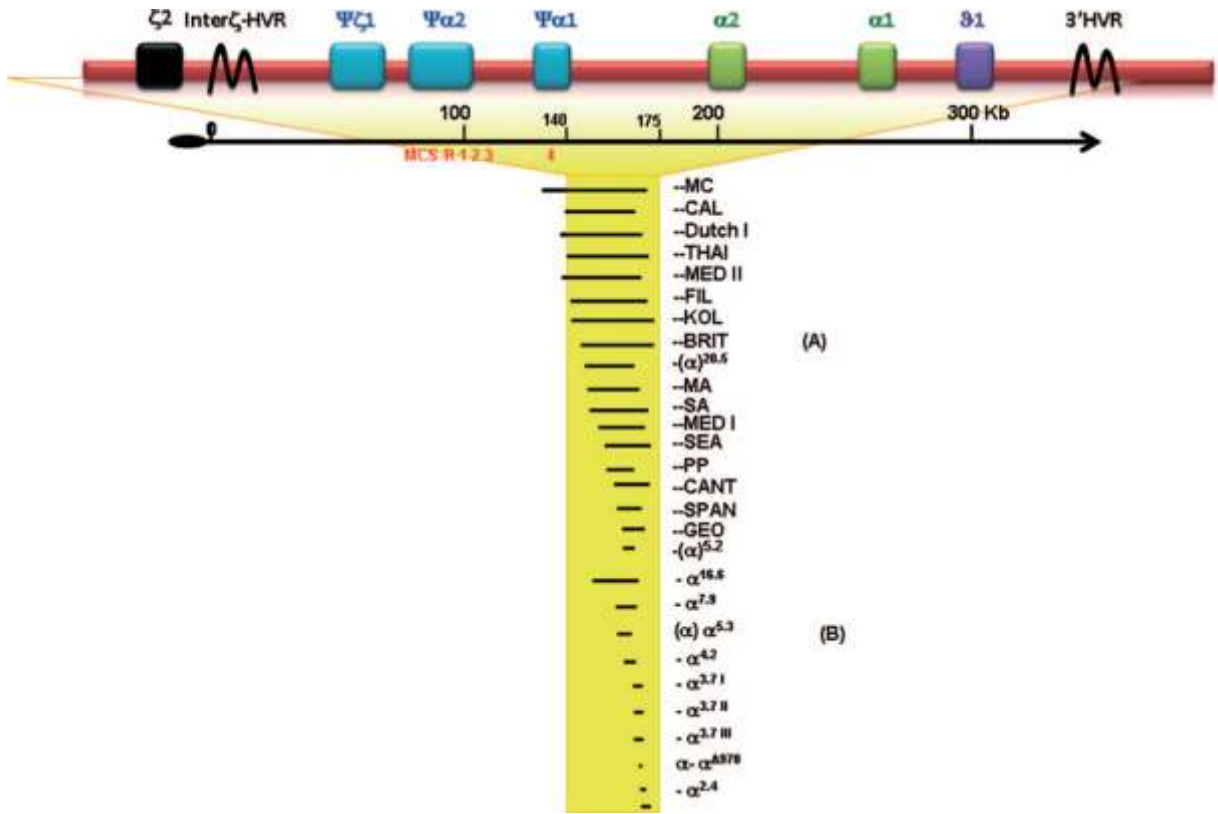
1. Delesyonlar: Alfa talasemide en sık rastlanılan hastalık sebebidir. Delesyonların genişliği önemlidir ve klinik fenotipi etkilemektedir.
2. Nokta mutasyonları: Beta talasemide siktır, alfa talasemide nadirdir.
3. Düzenleyici bölge - MCS (multispecies conserved sequences) mutasyonları: Genler sağlam olduğu halde zincir sentezini bozarak α talasemiye neden olmaktadır (Şekil 5) (1,19).



Şekil 5. Düzenleyici bölge (MCS-R) delesyonları.

Alfa 2 geni alfa 1 geninden 2-3 kat fazla alfa globin zinciri oluşturur. Alfa talasemi sendromlarında etkilenen alfa globin genine ve miktarına göre alfa zincir yapımı azalır ve bu azalmanın miktarına göre de klinik tablo değişir. Bir mutasyon bir kromozomdan ekspresyonu tamamen ortadan kaldırıyorsa α^0 talasemi, kısmi olarak ekspresyonu azaltıyorsa α^+ talasemi olarak adlandırılır (1).

Önceleri alfa talasemi mutasyonlarının fenotipi doğrudan etkilenmiş alfa globin gen sayısı ile ilişkilendirilirken, günümüzde fenotip ve genotipin daha karmaşık ve değişken olduğu bildirilmektedir. Fenotip çeşitleri sadece etkilenmiş alfa gen sayısına değil, alfa talasemi mutasyon tipiyle de bağlantılıdır. Geniş delesyonlar, delesyonel olmayan mutasyonlar, düzenleyici bölgede değişim, epigenetik genler ve unstabil mutasyonların hepsi fenotipin şiddetini artırıcı yönde etki göstermektedir. Bazı delesyonlar α^+ talasemiye, bazıları da α^0 talasemiye neden olmaktadır (Şekil 6) (1,19).



Şekil 6. Alfa globin gene kümesi. α^0 (A) ve α^+ (B) talasemiye neden olan delesyonlar.

2.5. Alfa Talasemi Kliniği

Alfa talaseminin klinik formları sessiz taşıyıcı, ağır alfa talasemi taşıyıcı, Hb H ve Hb Bart's hidrops fetalis sendromu olarak tanımlanır (1).

1- Sessiz Taşıyıcı (- α/α)

Tek bir α -globin gen delesyonundan kaynaklanır, α globin zincir sentezindeki azalma güçlükle saptanır. Yalnızca bir allel etkilendiğinde (heterozigot form) α^+ talasemi (- α/α) fenotipi oluşur. Tümüyle asemptomatiktir veya hafif mikrositoz ve hipokromi vardır ancak Hb elektroforezi normaldir (Hb A2 normal veya düşük, Hb F normal).

2- Ağır Alfa Talasemi Taşıyıcılığı (- $\alpha/-\alpha$ veya --/ $\alpha\alpha$)

α^0 -talasemi aynı kromozomdaki veya iki kromozomun her birindeki iki α -globin geninin delesyonunu (- $\alpha/-\alpha$ veya --/ $\alpha\alpha$) içerir. Her iki genetik örnek klinik olarak birbirine benzerdir. α^0 -talasemiye benzer klinik oluşturan diğer moleküler mekanizmalar şunlardır:

1. Alfa globin kümesindeki major düzenleyici elementlerin kaybolmasına yol açan delesyonlar
2. Alfa 1 geninde delesyon yapıp alfa 2 genini de etkileyen mutasyonlar
3. Alfa globin gen kümesi boyunca oluşan geniş delesyonlar

Yenidoğan evresinde %5-10 Hb Bart's vardır fakat 6 ay sonra kaybolur. Ağır alfa talasemi taşıyıcıları, klinik olarak normal fakat beta talasemi taşıyıcılarında görülen hematolojik bulguları, (hafif hipokrom mikrositer anemi) gösterirler. Homozigot α^0 talasemi taşıyıcılarına benzer klinik bulgular ortaya çıkar (1).

3- Hemoglobin H (Hb H) Hastalığı

Orta-ağır hemolitik anemiye yol açan klinik olarak çok değişken bir grup hastalıktır. Bazı hastalarda hiç transfüzyon gereksinimi olmazken (Transfüzyona bağımlı olmayan talasemi), bazılarında aralıklı hatta düzenli transfüzyon gerekebilir (Transfüzyona bağımlı talasemi). Hb H hastalığının en sık nedeni 3 alfa globin genindeki delesyondur ($-\alpha/--$). Diğerleri ise, $\alpha 1$ veya $\alpha 2$ geninde 2 gen delesyonu ve bir nokta mutasyonu ($\alpha T\alpha/--$) ($\alpha\alpha T/--$) veya özellikle $\alpha 2$ geninde ağır nokta mutasyonlarıdır ($\alpha T\alpha/ \alpha T\alpha$) (delesyonel olmayan Hb H). Hb H hastalığında yenidoğan devresinde %20-40 oranında Hb Bart's gözlenir, daha sonra bunun yerini %5-30 oranında Hb H alır (1).

Hb H hastalığının klinik şiddeti esas olarak alfa genindeki mutasyonlara bağlı olsa da beta talasemi ve unstabil beta globin varyantları birlikteliği de klinik tablonun şekillenmesinde etkilidir. Aynı alfa talasemi mutasyonuna sahip olan hastaların bazıları hafif, bazıları orta hatta bazıları ağır derecede anemiye sahip iken beta talasemi mutasyonu birlikteliğinde, alfa ve beta zincirleri arasındaki dengesizlik azaldığı için klinik hafifleyebilmektedir (1).

Alfa gen triplikasyonu ve heterozigot β -talasemi mutasyonu bir arada olduğunda β -talasemi taşıyıcılığından daha ağır bir anemi ve Hb F yüksekliği (%2-15 arasında) gösteren talasemi intermedia tablosu görülür. Çocukta Talasemi İntermedia kliniği olup anne ve babadan sadece birinde β -talasemi taşıyıcılığı olması bu olasılığı düşündürmelidir (1).

4. Hb-Bart's Hidrops Fetalis Sendromu

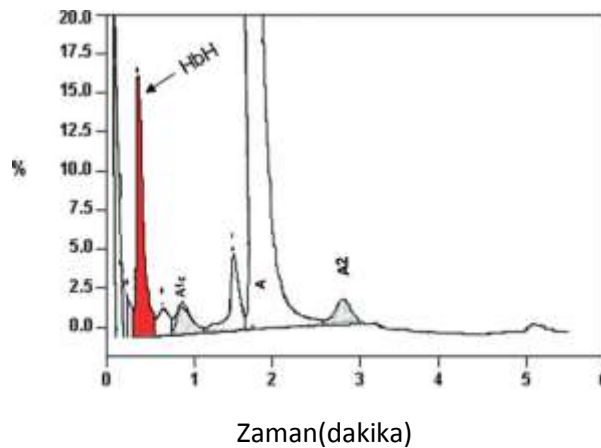
Dört α -globin allelinin tümünün delesyona uğraması veya inaktif olması sonucu α -globinin sentezlenemediği durumda alfa talaseminin en ağır formu olan Hb Bart's hidrops fetalis gelişir. Etkilenen fetus HbF ve A yapmak için herhangi bir α -globin zinciri üretemez. Fetal kan başlıca Hb Bart's içerir. Değişken miktarda bulunan Hb Portland O₂ taşıyarak bebekleri canlı tutar. Ağır intrauterin anemi kalp yetmezliğine yol açar. Belirgin hepatosplenomegali, yaygın ödem, asit, iskelet ve kardiyovasküler deformiteler gelişir. Doğumdan sonra ağır anemiye bağlı gelişen şok tedavisinde kan transfüzyonu, yaşam destek tedavisi gerekir yoksa kısa sürede bebek kaybedilir. Gebeliğin erken döneminde tanı konulursa intrauterin transfüzyonlarla gebelik takip edilip erken doğum yaptırılır (1).

2.6.Fizyopatoloji

Alfa-talasemide β -zinciri göreceli olarak α -zincirinden daha fazla yapılır. Fazla olan beta zincirleri tetramer yapar, hem ile bağlanır ve durağan olmayan bir Hb olan Hb H oluşur. Alfa talasemi taşıyıcılarında Hb H sadece kordon kanında saptanırken, Hb H hastalığında periferik kanda da yüksektir ve dayanıksız bir Hb olan Hb H'nin eritrositler içinde çökmesine bağlı olarak hemolitik anemi gözlenir. Periferik kanda retikülosit boyası ile bu presipitasyonlar gösterilebilir (Hb H inklüzyon cisimcikleri). Kemik iliğinde ise eritroid ana hücrelerin olgunlaşma süreci normal olup diseritropoez ve periferik yaymada normoblast görülmez. Retikülosit sayısı ise anemiyle orantılı olacak şekilde yüksek olabilir (1).

2.7.Alfa Talasemide Tanı

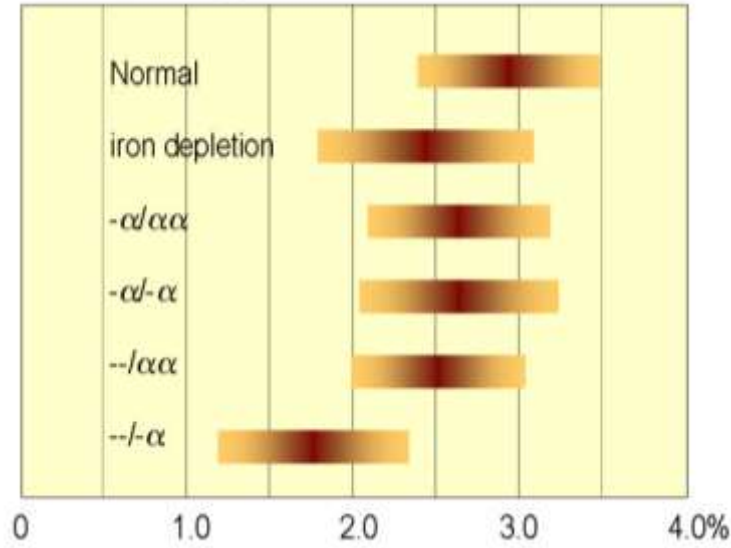
Tek gen mutasyonları klinik ve hematolojik olarak normal olduklarından moleküler çalışma olmaksızın tanınamazlar. Ağır taşıyıcılar açıklanamayan hipokrom mikrositer anemi olarak başvurabilirler. Bu kişilerde yapılan testlerle demir eksikliği (serum demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin ile), beta talasemi taşıyıcılığı (Hb elektroforezi ile) ve kronik hastalık anemisi dışlanmışsa moleküler testlerle alfa talasemi ayırıcı tanısı yapılır. Hb H hastaları talasemi intermedia kliniği ile başvururlar. Orta-ağır hipokrom mikrositer anemi ve retikülositoz vardır. Periferik yaymada target hücreleri, anizositoz, poikilositoz ve polikromazi saptanır. Hb Constang Spring gibi bazı HbH'lerde eritrositlerde belirgin bazofilik noktalanma bulunur. Hb H boyasıyla (Brillant Krezil boyası) ile eritrositlerde Hb H inklüzyon cisimcikleri (Pinpon topu gibi eritrositler), Hb elektroforezi ve kromatografide Hb H (%2-25 oranında) bandı görülür (Şekil 7) (2,20). Ancak bunun için taze kanda hemen Hb elektroforezi yapılmalıdır. Beklemiş kanda yapılan testte yanlış negatif sonuç saptanır (1).



Şekil 7. Hb H hastalığında HPLC patterni

Alfa talasemide alfa/beta globin zincir sentezi oranı 0.8'den küçüktür. Bu oran 0.75 ise tek gen delesyonu, 0.5 ise 2 gen delesyonu, 0.25 ise 3 gen delesyonu düşünülür (20).

Alfa talasemi taşıyıcılarında HbA2 düzeyi normalden daha düşükken, bu düşüklük Hb H hastalığında daha belirgindir (Şekil 8) (20).



Şekil 8. Farklı alfa talasemi genotiplerine Hb A2 düzeyi.

2.8.Prenatal Tanı

Hb H hastaları genelde hafif-orta ve transfüzyon gerektirmediğinden rutin prenatal tanı gerektirmez. Çiftlerden her ikisi de α^0 taşıyıcısı olduğu durumda %25 olasılıkla Hb H hastası olma olasılığı bulunduğundan sadece bunlara genetik danışma verilir. Ancak non-delesyonel Hb H formları hidrops fetalis riski taşıdığından özellikle daha önce etkilenmiş çocuğu olan riskli çiftlerde prenatal tanı yapılmalıdır. Prenatal tanı için fetal DNA örneği kordosentez, korion vilus örnekleme ve amniosentez yoluyla elde edilebilir (1).

Heterozigot bireyler normal olacaklarından genetik analiz yapılmadan saptanamazlar. α^0 taşıyıcılarını belirlemek için düşük Hb, MCV, MCH olan, Hb elektroforezi normal olup Hb A2 düşük bulunan ve demir eksikliği gibi başka bir nedeni bulunmayan bireylerde DNA analizi yapılır. Ağır hastalık riski olan çiftlere preimplantasyon genetik tanı ve in vitro fertilizasyon önerilir (1).

3. HEMOGLOBİNOPATİLERDE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

Hemoglobinopatilerde hastalarda ve taşıyıcılarda mutasyonların tayini için moleküler analiz teknikleri uygulanmadan önce hematolojik parametreler ve Hb elektroforezi sonuçları değerlendirilmelidir. Bu çalışmalar DNA analizinde hedef gen veya gen bölgesini belirlemede ve seçilecek moleküler analiz yöntemini belirlemede en önemli adımdır. Hasta veya taşıyıcılardaki hematolojik parametrelerin ve elektroforez sonuçlarının durumuna göre moleküler tanıda uygulanacak yöntemlerin seçimi yapılır. Bu yöntemlerin çoğu PCR'nun kullanıldığı tekniklerdir (21).

Hemoglobinopatilerin moleküler genetik tanısını yapan laboratuvarlar, ülkelerinin koşullarını, ülkelerinde sık görülen Hb bozukluklarının genetik özelliklerini, kendi laboratuvarlarındaki özel koşulları ve yöntemi uygulamadaki deneyimlerini göz önünde bulundurarak tanıda yol haritalarını belirlemelidir. Teknolojideki gelişmeler, yeni, hızlı ve yüksek doğrulukta moleküler genetik analiz yöntemlerinin keşfine ve Hb bozukluklarının tanısında da yeni uygulamalara yol açmaktadır. Hemoglobinopatilerin moleküler genetik tanısında kullanılan yöntemler klasik olarak iki gruba ayrılmaktadır (21):

3.1.Direkt mutasyon tayini yapan yöntemler

Doğrudan özgün mutasyonun olup olmadığını gösterirler. Nokta mutasyonları için Allel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon (ASO), Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS), dizi analizi gibi yöntemler, delesyonlar için de gap-PCR yöntemi bu gruba giren örneklerdir.

3.2.İndirekt yöntemler

Belirli bir gen veya gen bölgesini, dizi değişikliği olup olmadığının anlaşılması için, tarayan yöntemlerdir. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi ve Denatüre Edici Yüksek Performanslı Likid Kromatografi yöntemleri bu gruba girer. Bu yöntemlerle mutasyonun yerinin saptanmasından sonra dizi analizi ile özgün değişikliğin ortaya konulması gerekir. Otomatize ve hızlı uygulanabilen dizi analizi yöntemleri nokta mutasyonlarının daha sık olarak görüldüğü küçük genler (β globin geni gibi) için rutin uygulanabilecek teknikler arasında sayılmakta ise de, delesyonların olduğu gen ve gen bölgeleri için uygun değildir. Bu bölgeler için Southern-blot, gap- PCR gibi yöntemler halen geçerlidir. Bu yöntemlerin dışında son yıllarda Multiple Ligation Probe Analysis (MLPA), Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments (QMPSF), Real-time PCR, Melting Curve Analysis gibi yöntemler hızla kullanıma girmektedir (20,21).

3.3.Allel Spesifik Olgonükleotid Hibridizasyon

Bu yöntem hedef dizi ile, birisi mutasyonlu diğeri de normal dizi için hazırlanmış olan iki oligonükleotid probunun hibridizasyonuna dayanır. Yöntemde, belli mutasyonların sık olarak gözlemlendiği toplumlarda “dot blot” veya “reverse dot blot” şeklinde uygulama ile homozigot, heterozigot ve normal genotipe sahip olanlar kolayca saptanabilir. Ticari olarak üretilen, “reverse dot blot” yönteminin kullanıldığı kitler ile toplumlarda sık rastlanılan mutasyonların multipleks PCR ile çoğaltılan DNA’da kolayca tanımlanmasını mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemde normal ve mutasyonlu problemler membrana emdirilmiştir. Genomik DNA ile hibridizasyon sonucunda normal ve mutant paralel bantlar değerlendirilerek tanı konur. Ülkemizde rastlanılan alfa globin ve beta globin mutasyonlarının büyük kısmını (%90-95 oranında) kapsayan ticari kitler bulunmaktadır (ViennaLab StripAssay) (1,21).

3.4.DNA Dizi Analizi

Moleküler tanı koymada en güvenilir yöntemlerdendir. Daha çok nokta mutasyonlarının sık görüldüğü ve mutasyon dağılımı geniş olan toplumlarda β globin geni analizi için bazı laboratuvarlarda ilk yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca birçok laboratuvar, diğer ucuz ve pratik tanı yöntemleri ile gösterilemeyen mutasyonları saptamak için uygulanmaktadır.

Bu yöntem α talasemi gibi büyük delesyonların bulunduğu Hb bozuklukları için uygun değildir (21).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi polikliniğinde 1 Ocak 2010 ile 30 Haziran 2015 yılları arasında demir eksikliği anemisi ve beta talasemi taşıyıcılığı dışlanmış (ferritin normal; Hb A2 < %3.5) ve alfa talasemi taşıyıcılığı düşünülüp tanıları mutasyon analizi ile konfirme edilen 52 hasta çalışmaya alındı. Bu olguların tanı anındaki tam kan sayımı parametreleri ve Hb A2 düzeyi dosya taraması ya da bilgisayar kayıt sisteminden taranarak kaydedildi.

Hastaların hemogramları Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda Mindray marka BC-6800 model kan sayımı cihazıyla çalışıldı.

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

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda Strip Assay yöntemiyle α -talasemi mutasyon analizi için önce hastalardan EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örneğinde DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra alfa globin gen bölgelerine ait biotin işaretli primerler kullanılarak PCR multipleks yöntemi ile in vitro amplifikasyon yapıldı ve amplifikasyon ürünlerinde alfa globin genindeki mutasyonlar reverse hibridizasyon prensibine dayalı ViennaLab α -globin StripAssay™ ticari kiti (ViennaLab Labordiagnostica, Austria) kullanılarak tespit edildi. Bu kit ile değerlendirilen mutasyonlar Tablo I'de gösterildi.

Stript analizi ile mutasyon saptanamayan 50 hastada Antalya Genetik Laboratuvarı'nda alfa 1 ve alfa 2 genlerinde DNA dizi analizi ile mutasyon taraması yapıldı.

Tablo I. ViennaLab α -globin StripAssay ile değerlendirilen mutasyonlar.

No	Pozisyonu	Dizi değişimi
1	-a3.7	tek gen delesyonu
2	-a4.2	tek gen delesyonu
3	-(a)20.5	çift gen delesyonu
4	--MED	ift gen delesyonu
5	--SEA	ift gen delesyonu
6	--THAI	ift gen delesyonu
7	--FIL	ift gen delesyonu
8	a1 cd 14	G>A
9	a1 cd 59	G>A (Hb Adana)
10	aaa anti ^{-3.7}	Gen triplikasyonu
11	a2 init.cd	ATG>ACG
12	a2 cd 19	-G
13	a2 IVS1	5 bp delesyon
14	a2 cd 59	G>A
15	a2 cd 125	T>C (Hb Quong Sze)
16	a2 cd 142	T>C (Hb Constant Spring)
17	a2 cd 142	T>A (Hb Icaria)
18	a2 cd 142	A>T (Hb Pakse)
19	a2 cd 142	A>C (Hb Koya Dora)
20	a2 poliA-1	AATAAA>AATAAG (Saudi tipi)
21	a2 poliA-2	AATAAA>AATGAA (Türk tipi)

DNA DİZİ ANALİZİ

Periferal kandan DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonları olgular çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra gerekli izinler alınarak toplanan 5cc periferal kan örneğinden ticari kit (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilen genomik DNA rnekleri Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek saflık ve miktar açısından kontrol edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hedef DNA fragmentinin vitro şartlarda çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

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

Polimeraz zincir reaksiyonunun ilk aşamasında çift iplikli DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilir. Denatürasyon aşamasından sonra reaksiyon ortamı kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür ve oligonükleotit primerler komplementer bölgelere bağlanır. Son aşamada Taq DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 5'→3'yönünde uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkar.

Yapılan bu çalışmada, hematolojik olarak alfa talasemi şüphesi bulunan 40 hastaya ait DNA örneklerinden HBA1 ve HBA2 genlerinin ayrı ayrı çoğaltılmasına olanak sağlayacak şekilde PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve reaksiyon koşulları aşağıda verilmektedir. HBA1 geninin çoğaltılmasında HBA1F-HBA1R primer çifti, HBA2 geninin çoğaltılmasında HBA1F-HBA2R primer çifti kullanılmıştır.

Tablo II. HBA1 ve HBA2 genlerinin PCR yöntemiyle ayrı ayrı çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri.

HBA1F	5'-CTGTCTCCTGCCGACAAGACC-3'
HBA1R	5'-GGGGGGAGGCCCAAGGGCAAGAA-3'
HBA2 R	5'-GGGAGGCCAGCGGGCAGGAGGAAC-3'

DNA dizileri için 25 µl'lik reaksiyon karışımı;

0,1-1 µg kalıp DNA

1X PCR tamponu

10 pmol ileri ve geri primer

200 µM dNTP karışımı

1,5 mM MgCl₂

1 U Taq polimeraz enzimi,

dH₂O ile hazırlandı.

Bu işlem 0,2 ml'lik PCR tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına (Verity, AB, ABD) yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 60 saniye..... denatürasyon

64°C'de 45 saniye..... bağlanma 35 döngü

72°C'de 90saniye..... sentez

72°C'de 7 dakikalık son uzama

PCR uygulamalarında kontaminasyonun takibi için ek olarak negatif kontrol de çalışmaya eklendi. Negatif kontrol için PCR bileşenleri, örnekler ile aynı miktarda olup kalıp DNA kullanılmadı, son hacim ise distile su ile tamamlandı.

3.3. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi

Agaroz jel elektroforezi ile DNA tayininde, çözünmüş haldeki DNA parçaları elektrikakımı ve jelde oluşan porlar sayesinde büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu sayede DNA molekülleri ayırt edilebilmektedir. Küçük DNA fragmanları için yüksek agaroz konsantrasyonu, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. Ayrıca agaroz jel hazırlanırken DNA'nın görünür hale gelmesi için Etidyum bromür (EtBr) kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki EtBr, DNA'ya enterkalasyonu neticesinde DNA UV ışık altında agaroz jelde görünür hale gelir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç olan DNA kullanılarak, moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir.

Bu çalışmada PCR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunun ve kalitesinin kontrolü için jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 50 ml 1X TBE içerisinde 1 g agaroz ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Konsantrasyonu 10 mg/ml olan EtBr'den 2,5 µl ilave edilerek jel düzeneğine uygun taraklar takılarak döküldü. Jel donduktan sonra taraklar

dikkatlice çıkarıldı ve düzenek içerisinde 1X TBE bulunan tanka yerleştirildi. Kuyucuklara örnekler ve belirteç DNA yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. Yüklenen DNA örnekleri 30 dakika 120 volt sabit voltajda koşturuldu ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi. HBA1 için 735 bp ve HBA2 için 725 bp amplifikasyon ürünlerinin varlığı DNA belirteci ile kıyaslanarak kontrol edildi.

PCR ürünlerinin saflaştırılması

Dizi analizi reaksiyonu öncesi PCR karışımındaki primer, dNTP gibi reaksiyon artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması için PCR ürünleri ticari kit (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda saflaştırıldı. Saflaştırılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yukarıda belirtildiği şekilde incelenerek kontrol edildi.

3.5. DNA dizileme reaksiyonu

Yapılan bu çalışmada da HBA1 ve HBA2 genlerine ait DNA dizilerinin tespiti için Sanger metoduna dayanan otomatik dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla dizileme reaksiyon karışımı hazırlandı.

20 µl'lik reaksiyon karışımı:

- 35-50 ng saflaştırılmış PCR ürünü
- 4 µl dizileme reaksiyon karışımı (Sequencing mix, BigDye)
- 3,2 pmol primer (ileri veya geri)
- dH₂O içermektedir.

Bu işlem 0,2 ml'lik PCR tüplerinde ve buz içerisinde gerçekleştirildi ve tüpler ısı döngü cihazına (Verity, AB, ABD) yerleştirilerek aşağıda belirtilen program uygulandı.

96°C'de 20 saniye..... denatürasyon

50 °C'de 20 saniye..... bağlanma 30 döngü

60°C'de 4 dakika..... sentez

Tablo III. HBA1 ve HBA2 genlerinin DNA dizileme reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.

HBA1F	5'-CTGTCTCCTGCCGACAAGACC-3'
HBA1R	5'-GGGGGGAGGCCCAAGGGGCAAGAA-3'
HBA2 R	5'-GGGAGGCCCGAGCGGGCAGGAGGAAC-3'
HBA1/2BF	5'-ACCACCAAGACCTACTTCC-3'
HBA1/2CR	5'-GCTCACCTTGAAGTTGACC-3'

DNA dizi analizi reaksiyonu örneklerinin saflaştırılması

Dizileme reaksiyonu sonrası reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması etanol (EtOH) ile çöktürme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğin üstüne 3ul 3M NaAcve 60 µl soğuk absolü EtOH ilave edilip vortekslendi. Buz üzerinde 20 dakika bekletildi. +4 0C'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst faz uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine %70'lik soğuk etanolden 200 µl ilave edilip +4 0C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst faz uzaklaştırıldıktan sonra örnekler karanlıkta 20 dakika kurumaya bırakıldı. Örnekler otomatik dizi analizi cihazına yüklenene kadar -20⁰C'de saklandı.

Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi

Presipite edilmiş DNA dizi analizi ürünleri 20 µl Hi-Diformamid içerisinde çözülerek kapiller elektroforezleri üretici firma tarafından belirtilen koşullara göre 3100 (Applied Biosystem, ABD) marka otomatik dizi analizi cihazında gerçekleştirildi.

DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Hastalardan elde edilen dizi analizi sonuçları HBA1 ve HBA2 genlerine ait referans diziler ile karşılaştırılarak DNA dizi farklılıkları tespit edildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 18.0 paket programı kullanıldı. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılıma uygun olan nicel değişkenlerin iki bağımsız grup arasındaki karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi. Normal dağılıma uygun olmayan nicel değişkenlerin iki bağımsız grup arasındaki karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi Polikliniği'nde 1 Ocak 2010-30 Haziran 2015 tarihleri arasında tam kan sayımı parametreleri ile talasemi taşıyıcılığı düşünülen, Hb elektroforezi ile beta-talasemi taşıyıcılığı olmadığı gösterilen ($HbA_2 < 3,5$) ve alfa talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan 52 hasta çalışmaya alındı. Hastaların 50'sine alfa talasemi taşıyıcılığı tanısının sırtıpt analizi yöntemiyle; sırtıpt analizi ile mutasyon saptanmayan (RBC yüksek, MCV düşük, ferritin ve HbA_2 normal olan) 50 hastanın ikisine de DNA dizi analizi yöntemiyle alfa talasemi taşıyıcılığı tanısı konulduğu öğrenildi.

Hastaların 31'i (%59.6) erkek, 21'i (%40.4) kızdı (Şekil 1).



Şekil 9. Cinsiyete göre hastaların dağılımı.

Hastaların yaş ortalaması 7.62 ± 5.01 yıl (dağılım 0.5-16) idi.

Hastalarımızda 12 farklı genotip ve 11 farklı mutasyon saptandı. En sık rastladığımız 4 genotip sırasıyla $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$, $--^{20,5}/\alpha\alpha$ ve $--^{MED}/\alpha\alpha$; en sık rastladığımız 4 allel ise sırasıyla $-\alpha^{3,7}$, $--^{20,5}$, $--^{MED}$ ve $\alpha 2^{PolyA-1}$ idi. Mutasyonların genotip dağılımı ve sıklığı Tablo IV; allel dağılım ve sıklığı ise Tablo V'de gösterildi.

Tablo IV. Alfa talasemilerin genotip dağılımı ve sıklığı.

Genotip	n	%
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	21	40,4
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	7	13,5
$--^{20,5}/\alpha\alpha$	6	11,5
$--^{MED}/\alpha\alpha$	5	9,6
$\alpha 2^{PolyA-1}/\alpha\alpha$	4	7,7
$(-\alpha)^{20,5}/\alpha\alpha$	2	3,8
$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$	2	3,8
$\alpha 2^{IVS1(-5nt)}/\alpha 2^{IVS1(-5nt)}$	1	1,9
$\alpha 2^{PolyA-2}/\alpha\alpha$	1	1,9
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3,7}$	1	1,9
HbA1:c.328del C	1	1,9
HBA2:c.93_95+2 del GAGGT	1	1,9

Tablo V. Alfa talasemi mutasyonlarının allel dağılım ve sıklığı.

Mutasyon	n	%
- $\alpha^{3,7}$	35	33,65
-- ^{20,5}	8	7,68
-- ^{MED}	5	4,80
$\alpha 2^{\text{PolyA-1}}$	4	3,84
$\alpha 2^{\text{IVS1(-5nt)}}$	2	1,92
- $\alpha^{4,2}$	2	1,92
$\alpha 2^{\text{PolyA-2}}$	2	1,92
HbA1:c.328delC	1	0,91
HBA2:c.93_95+2 del GAGGT	1	0.91
$\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$	1	0,91

Hastaların ortalama Hb düzeyi 11.64±1.59 gr/dl (dağılım, 8.70-15.60gr/dl), ortalama RBC düzeyi 5.65±0.51 (dağılım, 4.46-7.25), ortalama MCV düzeyi 65.46±7.15 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH düzeyi 20.96±2.44 pg (dağılım,14.30-26.30), ortalama RDW düzeyi 16.20±2.16 (dağılım, 12.20-23.00), HbA2 düzeyi %2.46±0.37 (dağılım, 1.62±3,10) idi.

Alfa 3.7 heterozigot tek gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 11.95±1.49 gr/dl (dağılım, 8.70-15.30gr/dl), ortalama RBC düzeyi 5.48±0.51 (dağılım, 4.46-6.23), ortalama MCV düzeyi 68.74±8.00 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH düzeyi 22.09±2.84 pg (dağılım,14.50-26.30), ortalama RDW düzeyi 16.31±2.84 (dağılım, 12.20-23.00), HbA2 düzeyi %2.53±0.37 (dağılım, 1.65±3,05) idi.

Alfa 3.7 homozigot tek gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 11.61±1.55 gr/dl (dağılım, 8.90-13.50), ortalama RBC düzeyi 5.98±0.74 (dağılım, 4.96-7.25), ortalama MCV düzeyi 59.94±3.01 fl (dağılım, 55.20-64.50), ortalama MCH düzeyi 19.38±0.94 pg (dağılım, 17.90-20.80), ortalama RDW düzeyi 16.62±1.66 (dağılım, 14.60-19.10), ortalama HbA2 düzeyi %2.59±0.33 (dağılım %2.04-3.10) idi.

Alfa 20.5 heterozigot çift gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 10.71 ± 0.43 gr/dl (dağılım, 10.30-11.30), ortalama RBC düzeyi 5.49 ± 0.22 (dağılım, 5.83-6.11), ortalama MCV düzeyi 60.08 ± 3.53 fl (dağılım, 54.70-65.50), ortalama MCH düzeyi 19.50 ± 0.91 pg (dağılım, 18.40-21.00), ortalama RDW düzeyi 16.93 ± 0.94 (dağılım, 15.80-18.50), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.11 \pm 0.51$ (dağılım $\%1.62-3.01$) idi.

MED heterozigot çift gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 11.06 ± 1.22 gr/dl (dağılım, 10.10-13.00), ortalama RBC düzeyi 5.71 ± 0.41 (dağılım, 5.44-6.37), ortalama MCV düzeyi 60.98 ± 2.51 fl (dağılım, 58.30-64.20), ortalama MCH düzeyi 18.89 ± 1.41 pg (dağılım, 17.60-20.20), ortalama RDW düzeyi 16.04 ± 1.21 (dağılım, 14.70-17.30), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.34 \pm 0.17$ (dağılım, 2.11-2.91) idi.

Alfa 2 Poly A-1 heterozigot saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 12.47 ± 0.72 gr/dl (dağılım, 11.90-13.40), ortalama RBC düzeyi 5.67 ± 0.39 (dağılım, 5.35-6.25), ortalama MCV düzeyi 68.32 ± 3.43 fl (dağılım, 64.50-72.70), ortalama MCH düzeyi 21.92 ± 1.19 pg (dağılım, 21.10-23.70), ortalama RDW düzeyi 14.70 ± 0.68 (dağılım, 13.80-15.40), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.52 \pm 0.36$ (dağılım, 2.01-2.78) idi.

Alfa 20.5 heterozigot tek gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 11.10 ± 1.41 gr/dl (dağılım, 10.10-12.10), ortalama RBC düzeyi 6.11 ± 0.39 (dağılım, 5.83-6.39), ortalama MCV düzeyi 62.45 ± 4.03 fl (dağılım, 59.60-63.30), ortalama MCH düzeyi 19.50 ± 0.84 pg (dağılım, 18.90-20.10), ortalama RDW düzeyi 17.90 ± 0.70 (dağılım, 17.40-18.40), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.24 \pm 0.15$ (dağılım $\%2.13-2.35$) idi.

Alfa 4.2 heterozigot tek gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 13.80 ± 2.54 gr/dl (dağılım, 12.00-15.00), ortalama RBC düzeyi 6.01 ± 0.33 (dağılım, 5.77-6.25), ortalama MCV düzeyi 68.30 ± 8.48 fl (dağılım, 62.30-74.30), ortalama MCH düzeyi 22.90 ± 2.96 pg (dağılım, 20.80-25.00), ortalama RDW düzeyi 14.20 ± 1.06 (dağılım, 13.50-15.00), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.58 \pm 0.01$ (dağılım, 2.57-2.59) idi.

Alfa 2 IVS1_5NT homozigot mutasyon saptanan olgunun Hb düzeyi 10.40 gr/dl, RBC düzeyi 5.49, MCV düzeyi 61.40 fl, MCH düzeyi 18.90 pg, RDW düzeyi 17.30, HbA2 düzeyi $\%2.79$ idi.

HbA2:c.93_95+2 del GAGGT saptanan olgunun Hb düzeyi 13.10 gr/dl, RBC düzeyi 5.49, ortalama MCV düzeyi 71.6 fl, MCH düzeyi 23.90 pg, RDW düzeyi 14.80, HbA2 düzeyi $\%2.37$ idi.

Alfa 2 Poly A-2 heterozigot saptanan olgunun Hb düzeyi 12.20gr/dl, RBC düzeyi 6.29, MCV düzeyi 78.40 fl, MCH düzeyi 23.10 pg, RDW düzeyi 14.00, HbA2 düzeyi %1.91 idi.

Alfa gen triplikasyonu saptanan olgunun Hb düzeyi 9.80 gr/dl, RBC düzeyi 5.18, MCV düzeyi 59.00 fl, MCH düzeyi 18.90 pg, RDW düzeyi 17.00, HbA2 düzeyi %2.67 idi.

HbA1:c.328delC saptanan olgunun Hb düzeyi 11.80 gr/dl, RBC düzeyi 5.51, MCV düzeyi 70.00 fl, MCH düzeyi 21.40 pg, RDW düzeyi 15.10, HbA2 düzeyi %2.46 idi.

Mutasyonların genotipine göre ortalama Hb, RBC, MCV, MCH, RDW ve HbA2 düzeyleri Tablo VI'da gösterildi.

Tablo VI. Mutasyon genotipine göre ortalama Hb, RBC, MCV, MCH ve RDW değerleri.

Genotip	Hb(gr/dl)	RBC($10^{12}/L$)	MCV(fl)	MCH(pg)	RDW	HbA2 (%)
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	11.75±1.87	5.38±0.80	68.74±8.00	22.09±2.84	16.31±2.93	2.53±0.37
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	11.61±1.55	5.98±0.74	59.94±3.01	19.38±0.94	16.62±1.66	2.59±0.33
$--^{20,5}/\alpha\alpha$	10.71±0.43	5.49±0.22	60.08±3.53	19.55±0.91	16.93±0.94	2.11±0.51
$--^{MED}/\alpha\alpha$	11.06±1.22	5.71±0.41	60.98±2.51	18.89±1.41	16.04±1.21	2.34±0.17
$\alpha 2^{PolyA-1}/\alpha\alpha$	12.47±0.72	5.67±0.39	68.32±3.43	21.92±1.19	14.70±0.68	2.52±0.36
$(-\alpha)^{20,5}/\alpha\alpha$	11.10±1.41	6.11±0.39	62.45±4.03	19.50±0.84	17.90±0.70	2.24±0.15
$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$	13.80±2.54	6.01±0.33	68.30±8.48	22.90±2.96	14.25±1.06	2.58±0.01
$\alpha 2^{IVS1(-5nt)}/\alpha 2^{IVS1(-5nt)}$	10.40	5.49	61.40	18.90	17.30	2.79
$\alpha 2^{PolyA-2}/\alpha\alpha$	12.20	6.29	78.10	23.10	14.00	1.91
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3,7}$	9.80	5.18	59.00	18.90	17.00	2.67
HbA1:c.328del	11.80	5.51	70.00	21.40	15.10	2.46
HBA2:c.93_95+2 del GAGGT 13.1		5.49	71.6	23.9	14.8	2.37

Elliki hastada gözlenen mutasyonların 45'i (%86.54) delesyonel, 7'si (%13.46) delesyonel olmayan mutasyondur. Delesyonel mutasyonların 34'ü tek gen delesyonu, 11'i çift gen delesyonu idi. Tek gen delesyonu mevcut olan hastaların ortalama Hb düzeyi 11.86±1.67 gr/dl (dağılım, 6.60-15.60), ortalama RBC sayısı 5.62±0.77 (dağılım, 2.51-7.25), ortalama MCV 66.78±7.38 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH 21.40±2.51 pg (dağılım, 14.50-26.30), ortalama RDW 16.38±2.53 (dağılım, 14.55-15.80), ortalama HbA2 düzeyi %2.52±0.34 (dağılım, %1.65-3.10) idi. Çift gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 10.93±0.83 gr/dl (dağılım, 10.10-13.00), ortalama RBC düzeyi 5.59±0.31 (dağılım,

5.10-6.37), ortalama MCV düzeyi 60.69 ± 3.1 fl (dağılım, 54.70-65.50), ortalama MCH düzeyi 19.30 ± 1.11 pg (dağılım, 17.60-21.00), ortalama RDW düzeyi 17.36 ± 3.18 (dağılım, 14.70-26.40), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.16 \pm 0.39$ (dağılım $\%1.62$ -3.01) idi. Tek ve çift gen delesyonu olan hastaların ortalama Hb, RBC, MCV, MCH, RDW ve HbA2 düzeyleri Tablo VII’de gösterilmiştir. Tek ve çift gen delesyonu grupları arasında Hb, RBC ve RDW değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken (p değeri sırasıyla 0.096, 0.476, 0.213). MCV, MCH ve HbA2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p değeri sırasıyla $<0,001$ $<0,001$, $=0,006$).

Tablo VII. Tek ve çift gen delesyonu olan hastaların ortalama Hb, RBC, MCV, MCH, RDW ve HbA2 düzeyleri.

Delesyon tipi	Hb (gr/dl)	RBC ($10^{12}/L$)	MCV (fl)	MCH (pg)	RDW	HbA2 (%)
Tek gen	11.86 ± 1.67	5.62 ± 0.77	66.78 ± 7.38	21.40 ± 2.51	16.38 ± 2.53	2.52 ± 0.34
Çift gen	10.93 ± 0.83	5.59 ± 0.31	60.69 ± 3.11	19.30 ± 1.11	17.36 ± 3.18	2.16 ± 0.39
P değeri	0.096	0.476	<0.001	<0.001	0.213	0.006

Hemoglobin düzeyi 52 hastanın 27’sinde ($\%51.92$) normal, 25’inde ($\%48.08$) düşüktü. Mikrositoz (MCV düşüklüğü) hastaların 48’inde ($\%92.31$), hipokromi (MCH düşüklüğü) tüm hastalarda, RBC yüksekliği 50 hastada ($\%96.15$) mevcuttu. RDW 47 hastada ($\%90.38$) yüksek, 5 hastada ($\%9.62$) normal saptandı.

Genotip dağılımına göre alfa talasemi taşıyıcılarında Hb, MCV, MCH, RBC ve RDW durumu Tablo VIII’de gösterilmiştir.

Tablo VIII. Genotip dağılımına göre alfa talasemi taşıyıcılarında Hb, MCV, MCH, RBC ve RDW durumu.

Genotip	HS	Hb		MCV		MCH		RBC		RDW	
		N	D	N	D	N	D	N	Y	N	Y
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	21	13	8	3	18	0	21	1	20	3	18
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	7	4	3	0	7	0	7	1	6	0	7
$--^{20,5}/\alpha\alpha$	6	1	5	0	6	0	6	0	6	0	6
$--^{MED}/\alpha\alpha$	5	1	4	0	5	0	5	0	5	0	5
$\alpha 2^{PolyA-1}/\alpha\alpha$	4	2	2	0	4	0	4	0	4	1	3
$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$	2	2	0	0	2	0	2	0	2	0	2
$(-\alpha)^{20,5}/\alpha\alpha$	2	1	1	0	2	0	2	0	2	0	2
$\alpha 2^{IVS1(-5nt)}/\alpha 2^{IVS1(-5nt)}$	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
$\alpha 2^{PolyA-2}/\alpha\alpha$	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3,7}$	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
HbA1:c.328del C	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
HBA2:c.93_95+2 del GAGGT	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Toplam	52	27	25	4	48	0	52	2	50	5	47

HS: Hasta Sayısı N: Normal D: Düşük Y: Yüksek

TARTIŞMA

Talasemi yönetiminde ülkelerin hemoglobinopati tarama programlarında genotiplendirme yöntemlerinin kullanılması yanı sıra, tarama ve tanı yöntemleri ile fenotipik değişkenliklerin gösterilmesi önemlidir. Bu şekilde halk sağlığı sorunu kabul edilen talasemi ve diğer varyant hemoglobinlerin doğumdan önce daha sık teşhis edilmesi mümkün olacaktır (9). Her ne kadar alfa globin geninin tamamında DNA dizinlemesiyle bilinmeyen mutasyonların tespiti uygulanabilir olsa da, çok pahalı olduğundan özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu teknoloji rutin olarak uygulanamamaktadır. Bunun için dizi analizinden önce ucuz, hızlı bir moleküler tespit metoduna ihtiyaç vardır (22). Son yıllarda piyasaya çıkarılan ve şu anda üçüncü nesli geliştirilmiş olan alfa globin Strip Assay (ViennaLab) adlı kit Türkiye’de talasemi tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır. Bu test PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur (23). Ülkemizdeki çalışmaların çoğunda Strip Assay ile mutasyon taraması yapılırken çalışmamızda Strip Assay yanı sıra bu yöntemle mutasyon saptanamayan 50 olguda DNA dizi analizi ile mutasyon varlığı araştırıldı.

Şimdiye kadar 54’ü alfa zincir varyantı olmak üzere 222 farklı alfa talasemi mutasyonu tanımlanmıştır (<http://www.ithanet.eu/>) (24). Biz çalışmamızda 12 farklı genotip ve 11 farklı mutasyon saptadık. En sık (%33.65) rastladığımız mutasyon olan $-\alpha^{3.7}$ gen delesyonunun dünyada yaygın bir dağılımı vardır. Ülkemizde, komşu ülkelerde ve çoğu toplumda en yaygın rastlanan mutasyon olarak bildirilmiştir (24-38).

Katar’da demir eksikliği anemisi ve beta talasemi taşıyıcılığı dışlanan ve alfa talasemi taşıyıcılığı şüpheli 127 çocukta $-\alpha^{3.7}$, α^{-5nt} , α^{polyA1} ($\alpha^{T-Saudi}$), α^{polyA2} mutasyonları araştırılmış ve 50 çocukta (%39.4) 3.7 kb delesyon (%30, heterozigot; %9.4 homozigot); 1 çocukta (%0.8) α^{-5nt} heterozigot mutasyon; 3 çocukta α^{polyA1} mutasyon (iki heterozigot, bir $-\alpha^{3.7}$ ile bileşik heterozigot) saptanmıştır (24).

Baysal (25) Birleşik Arap Emirlikleri’nde 419 yenidoğan bebeğin kord kanında PCR bazlı DNA analizi ile %49 oranında alfa talasemi saptanmış ve $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ %34, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ %11 ile en sık rastlanan genotipler olarak bildirilmiştir.

Hellani ve ark. (26) Suudi Arabistan’ın doğusunda hipokrom mikrositer anemili 41 kişide $-\alpha^{3.7}$ mutasyonunu %64 oranında bulduklarını bildirmişlerdir.

Sankar ve ark. (27) Hindistanın kuzeyinde 2003-2005 yılları arasında 275 hipokrom mikrositer anemili (125 beta talasemi trait, 48 talasemi major, 26 orak hücreli anemi, 15 Hb E, 40 demir eksikliği anemisi, 8 diğer hemolitik anemiler, 14 tanımlanamamış) kişide alfa talasemi taşıyıcılığı sıklığını araştırmışlar ve alfa talasemi taşıyıcılığı sıklığını %12.7 bulmuşlardır. $-\alpha^{3.7}$ allel frekasını %9, orak hücreli anemili kişilerde $-\alpha^{3.7}$ tek gen delesyonu sıklığını %30.8 bulmuşlardır.

Akhavan-Niaki ve ark. (28) İran'da alfa talasemi taşıyıcısı 722 erişkin (376 erkek, 346 kadın) hastanın 446 'sında delesyonel mutasyon ($-\alpha^{3.7}$: 367, $-\alpha^{4.2}$: 54, $--^{MED}$: 62), 215'inde bir nokta mutasyonu (polyA1:14, polyA2:133, -5nt:48, Hb Constant Spring:32), 61'inde 2 mutasyon ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$: 50, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$: 6, $-\alpha^{3.7}/\alpha^{PA2}$: 7, $-\alpha^{3.7}/\alpha^{CSP}$: 5) olmak üzere 10 farklı genotip saptamışlardır.

Al-Allawi ve ark.(29)Kuzeydoğu Irak'ta demir eksikliği ve beta talasemi taşıyıcılığı dışlanmış 101 hipokrom mikrositer Kürt erişkinde 4'ü delesyonel ($-\alpha^{3.7}$, $--^{MED-I}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $-\alpha^{4.2}$), 5'i delesyonel olmayan ($-\alpha^{PolyA1}$, α^{Adana} , $-\alpha^{5nt}$, α^{CS} , ve α^{PolyA2}) 9 farklı alfa talasemi mutasyonu ve 12 farklı genotip saptamışlar ve allel frekansı en yüksek mutasyon olarak $-\alpha^{3.7}$ (%59.6) bulmuşlardır.

Alibakhski ve ark. (30) Batı İran'da Kermanshah şehrinde 2009-2013 yılları arasında 678 alfa talasemi minörlü erişkinde 21 farklı mutasyon saptadıklarını en sık rastladıkları 3 mutasyonun $-\alpha^{3.7}$ (%60.9), α^{5nt} (%10.6) ve α^{PolyA4} (%9.9) olduğunu belirtmişlerdir.

Çelik ve ark. (31) 2008-2010 yılları arasında Hatay'da Medikal Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'na alfa talasemi şüphesiyle evlilik öncesi başvuran 39'u erkek, 58'i kadın 97 erişkin kişide %81.8'i delesyonel ($-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$, $--^{FIL}$, $-\alpha^{20.5}$), %18.2'si delesyonel olmayan ($\alpha^{2^{5nt}}$, $\alpha^{2^{Poly A1}}$, $\alpha^{2^{Poly A2}}$ ve $\alpha\alpha^{anti-3.7}$) 9 farklı mutasyon saptamışlardır. En sık rastlanan mutasyon olan alfa1 genindeki $-\alpha^{3.7}$ gen delesyonu 97 olgunun 74'ünde (%76.3); 194 allelin ise 85'inde (%43.81) saptanmıştır.

Öner ve ark. (32) 25 Hb H hastasında 10 farklı genotip saptamışlar ve $-\alpha^{3.7}$ allel sıklığını %28.6 olarak bildirilmişlerdir.

Güvenç ve ark. (33) Adana'da 2007-2008 yılları arasında evlilik öncesi tarama yapılan 3000 kişide demir eksikliği ve beta talasemi taşıyıcılığı olmayan kişilerde alfa mutasyon analizi yapmışlar ve alfa talasemi prevalansını %7.5 olarak bulmuşlardır. Onbir farklı genotip arasında en sık $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (%53.33) ve $--^{MED}/\alpha\alpha$ (%15.11) mutasyonlarına rastlamışlardır. Bu

çalışmada $-\alpha^{3.7}$ delesyonu 225 hastadaki 450 allelin 181'inde saptanmış ve allel frekansı %40.66 olarak bulunmuştur.

Bozdoğan ve ark. (34) Adana'da hafif ve orta derecede anemi, mikrositoz ve normal demir düzeyi olan 2500 hastanın 539'unda alfa mutasyon analizi çalışması yapmışlar ve 12 farklı mutasyon ve 29 farklı genotip saptamışlardır. En sık rastlanan mutasyonlar $-\alpha^{3.7}$ (%63.3), $-\alpha^{MED}$ (%11.7), $-\alpha^{20.5}$ (%10.7), $\alpha^{2^{IVS1(-5nt)}}$ (%3.9) ve $\alpha^{2^{polyA-2}}$ (%3.5); En sık rastlanan genotipler ise $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (%35.8), $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (%18.9), $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ (%11.5) ve $-\alpha^{MED}/\alpha\alpha$ (%10.4) olarak bildirilmiştir.

Onay ve ark. (35) 2007-2013 yılları arasında Ege Üniversitesi'nde alfa globin gen mutasyonu için gönderilen 231 hastada 5'i delesyonel ($-\alpha^{3.7}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{MED}$, $--^{FIL}$, $--^{SEA}$) 7'si delesyonel olmayan (α^{PA-1} , α^{5ntdel} , $\alpha\alpha^{anti-3.7}$, α^{cd142} , α^{PA-2} , α^{cd59} , α^{IC}) olmak üzere 12 farklı mutasyon ve 25 farklı genotip saptamışlar ve en sık rastlanan mutasyon olarak $-\alpha^{3.7}$ (%52.28), $-(\alpha)^{20.5}$ (%14.74) ve $--^{MED}$ (%10.53) bulmuşlardır.

Aldemir ve İzmirli (36) Hatay'da 2012-2013 yılları arasında toplam 407 bireyde $-\alpha^{3.7}$, $--^{MED}$, $\alpha^{COD8(-AA)}$, $\alpha^{2^{IVS 1-5nt}}$, $\alpha^{2^{poly A1}}$ mutasyonlarının frekanslarını sırası ile %29.48, %5.16, %0.25, %0.25, %0.25 olarak bulmuşlardır.

Karakaş ve ark. (37) tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Strip Assay yöntemiyle yapılan değerlendirmede tanımlanamayan hipokrom mikrositer anemisi olan 132 hastada 11 farklı mutasyon saptanmıştır. En sık görülen mutasyon $-\alpha^{3.7}$ (%44) tek gen delesyonu olup, bunu sırasıyla $\alpha^{20.5}$ (%14,8) ve α^{MED} (%12,8) çift gen delesyonları, delesyonel olmayan mutasyonlar ($\alpha-25nt$, (%7,4), triplikasyon, Hb Kayo Dora ve $\alpha-2poly A-1$ (%5,5), $\alpha^{24.2}$, Hb Adana, Hb Icaria ve FIL mutasyonu (%1,8) izlemiştir.

Ünal ve Gümrük (38) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1981-2014 yılları arasında 788 talasemi hastasının 138'ine (%17.5) Hb H hastalığı tanısı konulduğunu bildirmişlerdir. Genotip verileri mevcut olan 38 hastada en sık rastladıkları allellerin $-\alpha^{3.7}$ (%62.8), $\alpha^{20.5}$ (%51.4), $--^{MED-II}$ (%25.7), $--^{MED-I}$ (%17) olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 78 alfa talasemi taşıyıcısı çocukta 11 farklı genotip saptadıklarını ve en sık rastladıkları genotiplerin $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (%39.7), $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ (%26.9), $--^{MED-II}/\alpha\alpha$ (%10.3) ve $\alpha(PA-1)/\alpha\alpha$ (%6.4) olduğunu bildirmişlerdir.

Mutasyonların görülme sıklığı etnik kökenden ve coğrafik bölgelerden etkilenmektedir. Farklı toplumlarda ya da aynı toplumda farklı bölgelerde sık rastlanan mutasyonlar farklı olabilmektedir (39-48)..

Bahreyn’de Jassim ve ark. (39) yaşları 14 gün ile 78 yaş arasında değişen 56 kişide en sık alfa talasemi mutasyonu olarak αpolyA1 (%53.0) saptamışlardır.

Çin’in güneyinde Guizhou şehrinde 1219 yenidoğan bebeğin kord kanında Hb elektroforezi ve DNA analizi yapılan incelemede %3.28 oranında alfa talasemi taşıyıcılığı saptanmış ve en sık rastlanan mutasyon olarak $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ (%42.5) ve $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (%35) bulunmuştur. Aynı çalışmada yaşları 3 ay-60 yaş arasında değişen 121’i erkek 103 ‘ü bayan 224 alfa talasemi hastasında 11 farklı genotip ve 5 farklı alfa mutasyonu saptanmış ve en sık rastlanan mutasyon olarak yine $-\text{SEA}$ (%65.89) ve $-\alpha^{3.7}$ (%22.8) bulunmuştur(40). $-\text{SEA}$ mutasyonu Çin’in güney bölgesinde ki Yunnan (41), Hunan (42), Guanxi (43), Guandong’da (44) da en sık rastlanan mutasyonken (sıklığı sırasıyla %59.2; %75; %68.5; %48.54) Chongqin şehrinde (45) $-\alpha^{3.7}$ (%54.55) en sık rastlanan mutasyon olarak saptanmıştır

Sütçü ve ark. (46) Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematolojisi polikliniğine başvuran ve alfa talasemi mutasyonu araştırılan 25 hastada 9 heterozigot formunda allel taşıdığını saptamışlardır. Bu hastaların 5 tanesinde MED double gen delesyonu (heterozigot mutasyon), iki tanesinde -20.5 kb single gen delesyonu (heterozigot mutasyon), bir tanesinde $\alpha 2\text{IVS } 1-5$ nt delesyonu (heterozigot) ve diğer bir tanesinde -3.7 single gen delesyonu (heterozigot) ($-\alpha^{3.7}$ allel frekansı %5.55) tespit edilmiştir.

Lin ve ark. (47)Tayvan’da en sık SEA tip delesyon daha sonra da $-\alpha^{3.7}$ delesyonu saptamışlardır.

Ahmad ve ark.(48) 2007-2010 yılları arasında Malezya’da alfa talasemi tanısı konulan 2567 kişide 13 mutasyon incelemişler ve $-\text{SEA}$, $-\text{THAI}$, $-\text{FIL}$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$; Cd59G > A (Hb Adana), Cd125T > C (Hb Quong Sze) ve Cd142 (Hb Constant Spring) olmak üzere 8 farklı mutasyon saptamışlardır. Malay, Indian, Sabahan, Sarawakian ve Orang Asli halkında en sık $-\alpha^{3.7}$ delesyon saptanırken, Çinlilerde en sık $-\text{SEA}$ delesyonu saptadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 2. sıklıkta bulduğumuz mutasyon $-\alpha^{20.5}$ idi. Allel frekansını 7.68 olarak saptadık. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $-\alpha^{20.5}$ allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul’da %14.8, Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi’nde %14.74, Çelik ve ark. (31) Hatay’da %0.51, Öner ve ark.(32)%22, Çürük (48) Çukurova’da %18.75; Güvenç ve ark. (33)

Adana’da %3.33; Sütçü ve ark. (46) Isparta’da %11.1; Baysal ve ark. (49) Kıbrıs Türkleri’nde %4 bulmuşlardır.

Çalışmamızda 3. sıklıkta bulduğumuz mutasyon --^{MED} idi. Allel frekansını %4.8 saptadık. Bu oran Ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan daha düşüktü. Ülkemizde yapılan çalışmalarda --^{MED} allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul’da %12.8, Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi’nde %10.53, Çelik ve ark.(31) Hatay’da %5.67, Öner ve ark. (32) %20, Çürük (48) Çukurova’da %14.6; Güvenç ve ark. (33) Adana’da %9.55; Sütçü ve ark. (46) Isparta’da %27.77; Baysal ve ark. (49) Kıbrıs Türkleri’nde %40 bulmuşlardır.

Çalışmamızda 4. sıklıkta bulduğumuz mutasyon $\alpha 2^{\text{polyA1}}$ idi. Allel frekansını %3.84 saptadık. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $\alpha 2^{\text{polyA1}}$ allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul’da %3.7, Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi’nde %8.77, Çelik ve ark. (31) Hatay’da %0.51, Çürük (48) Çukurova’da %4.68; Güvenç ve ark. (33) Adana’da %0.66; Baysal ve ark. (49) Kıbrıs Türkleri’nde %12 bulmuşlardır. Öner ve ark (32) ile Sütçü ve ark. (46) çalışmalarında bu mutasyona rastlamamışlardır.

Çalışmamızda 5. sıklıkta bulduğumuz mutasyon $-\alpha 2^{\text{IVS1(-5nt)}}$ idi. Allel frekansını %1.92 saptadık. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $-\alpha 2^{\text{5nt}}$ allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul’da %7.4, Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi’nde %3,86, Çelik ve ark. (31) Hatay’da %6.7, Öner ve ark. (32)%8, Çürük(48) Çukurova’da %4.68; Sütçü ve ark. (46) Isparta’da %5.55; Baysal ve ark. (49) Kıbrıs Türkleri’nde %100 bulmuşlardır. Güvenç ve ark. (33) bu çalışmalarında bu mutasyona rastlamamışlardır.

Çalışmamızda 6. sıklıkta bulduğumuz mutasyon $-\alpha^{4.2}$ idi. Allel frekansını %1.92 saptadık. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda $-\alpha^{4.2}$ allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul’da %1.8, Çelik ve ark. (31) Hatay’da %0.51, Öner ve ark. (32)%12, Çürük (48) Çukurova’da %1.56; Güvenç ve ark. (33) Adana’da %0.66 bulmuşlardır. Onay ve ark. (35), Sütçü ve ark. (46) ve Baysal ve ark. (49) çalışmalarında bu mutasyona rastlamamışlardır.

Çalışmamızda 7. sıklıkta bulduğumuz mutasyon $\alpha 2^{\text{PolyA-2}}$ idi. Allel frekansını %1.92 saptadık. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $\alpha 2^{\text{PolyA-2}}$ allel frekansını Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi’nde %0.70, Çelik ve ark. (31) Hatay’da %2.57, Öner ve ark. (32)%10, Çürük (48) Çukurova’da %7.81; Güvenç ve ark. (33) Adana’da %2; Baysal ve ark. (49) Kıbrıs Türkleri’nde %4 bulmuşlardır. Karakaş ve ark. (37) ile Sütçü ve ark. (46) çalışmalarında bu mutasyona rastlamamışlardır.

Çalışmamızda 1 hastada $\alpha\alpha^{anti3.7}$ saptadık (allel frekansı %0.91). Ülkemizde yapılan çalışmalarda $\alpha\alpha^{anti3.7}$ allel frekansını Karakaş ve ark. (37) İstanbul'da %5.5, Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi'nde %3.16, Çelik ve ark. (31) Hatay'da %1.54, Güvenç ve ark.(33) Adana'da %1.11; bulmuşlardır. Öner ve ark. (32), Çürük (48), Sütçü ve ark. (46), Baysal ve ark. (49) çalışmalarında bu mutasyona rastlamamışlardır.

Çalışmamızda bulduğumuz HBA1:c328 del C heterozigot mutasyon (HbVar ID: 2724;HGVS name: HBA1:c.328delC) Ülkemizde daha önce tanımlanmamış bir mutasyondur.

Çalışmamızda bir hastada rastladığımız alfa 2 geninde HBA2:c.93_95+2 del GAGGT mutasyonu daha önce tanımlanmamış ve veri tabanında olmayan bir genomik değişimdir. Kodon 30-31 ve intron 1'in kırılma bölgesini etkilediği için patolojik sonuçları olması öngörülmektedir. Ancak yeni bir mutasyon olarak değerlendirilebilmesi için aile taraması ile bu değişimi taşıyan başka kişilerin olup olmadığının değerlendirilmesi gerekecektir.

Delesyonel olmayan alfa talasemi mutasyonlarından $\alpha 2$ geni üzerinde iki farklı PolyA mutasyonu ve bir tane de 5 nükleotidlik (-5nt) küçük delesyon ile $\alpha 1$ geni üzerindeki nokta mutasyonu sonucu meydana gelen Hb Adana, Hb H hastaları ve onların aile çalışmaları sırasında tespit edilmiştir (50). Hb Adana $\alpha 1$ ya da $\alpha 2$ geninde olabilir. $\alpha 1$ genindeki mutasyon $\alpha 2$ 'ye göre daha hafif klinik bulgular vermektedir. Nainggolan ve ark (51) $\alpha 2$ genindeki homozigot mutasyonun hidrops fetalis ile seyrettiğini göstermişlerdir. Aksu ve ark. (52) Ankara'da hipokrom mikrositer anemisi, belirgin anizositozu, target hücre ve bazofilik notalanması olan iki aylık erkek çocukta Hb Adana (HBA1:c.179 G>A) saptamışlar ve beta talasemi intermedia ya da Hb H hastalığına benzer kliniği olduğunu gözlemişlerdir. Ebeveynlerinde heterozigot formunun mikrositoz ile seyrettiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda Hb Adana'ya rastlamadık.

Türkiye'de ilk kez $-\text{FIL}$ mutasyonu Çelik ve ark.'nın çalışmasında (31) bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $-\text{FIL}$ allel frekansını Onay ve ark. (35) Ege Bölgesi'nde %2.81, Çelik ve ark.(31) Hatay'da %0.51, Çürük (48) Çukurova'da %40 bulmuşlardır. Çalışmamızda bu mutasyona rastlamadık.

Onay ve ark. (35) α^{CS} , $--^{\text{SEA}}$ ve α^{IC} mutasyonlarını (allel sıklığı sırasıyla, %1.75, %0.35, %0.35) ülkemizde ilk kez bildirilmişlerdir. Çalışmamızda bu mutasyonlara rastlamadık.

Ayrıca çalışmamızda daha önce Ülkemizde görüldüğü bildirilen (17,33,48,53-56)-THAI, init.cd, Cd 19, Hb Icaria, Hb Pakse, Hb Koya Dora, Hb Stanleyville II ve homozigot 5nt delesyonu gibi mutasyonlara rastlamadık

Sessiz taşıyıcılarda tam kan sayımı parametreleri normal olabileceği gibi beta talasemi taşıyıcılığına benzer tablo görülebilmektedir. (17). Literatürde $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip olan bireylerdeki tam kan sayımı parametreleri Tablo IX'da gösterilmiştir. Çalışmamızda diğer çalışmalara göre MCV düşüklüğü ve RBC yüksekliği dikkat çekmektedir. Ayrıca $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip 21 olgunun 8'inde (%38.1) anemi, 18'inde (%85.71) MCV'de düşüklük (mikrositoz), bütün olgularda MCH'da düşüklük (hipokromi), 20'sinde (%95.24) RBC yüksekliği ve 18'inde (%85.71) RDW'de yükseklik (anizositoz) saptadık (Tablo IV). Bu sonuçlar bize sessiz alfa talasemi taşıyıcılarında RDW düzeyinin demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısında güvenilir bir gösterge olmadığını düşündürdü.

Tablo IX. Çalışmamızda ve literatürde $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip bireylerdeki hematolojik parametreler.

Literatür	N	Hb	MCV	MCH	RBC	RDW
Çalışmamız	21	11.95±1.49	68.74±8.00	22.09±2.84	5.48±0.51	16.31±2.93
Onay ve ark.(35)	81	12.28±1.74	71.99±5.84	-	5.27±0.48	16.83±3.81
Al-Allawi ve ark.(29).	33	13.24±1.45	74.00±4.87	24.45±1.78	-	-
Sankar ve ark. (57)	5	8.91±0.88	73.66±7.4	21.53±3.27	-	-
Bozdoğan ve ark. (34)	193	12.2±2.2	74.9±7.6	25±3.2	5.2±3.4	-
Güvenç ve ark (33).	120	-	75.57±7.55	25.65±2.35	-	-
Çelik ve ark. (31)	31	12.89±1.96	76.88±8.80	22.05±3.32	4.98±0.79	-
Jassim ve ark. (39)	7	11.56±1.8	71.0±9	22,6±3.4	4.95±1.0	-
Kamal ve ark. (24)	38	12.2±1.1,	74.8±3.9,	24.4±1.6	5.0±0.6	14.3±1.1

Literatürde $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ genotipine sahip olan bireylerdeki tam kan sayımı parametreleri Tablo X'da gösterilmiştir. RBC ortalaması bir çalışma dışında yüksekken, bu yükseklik çalışmamızda daha belirgindi. Çalışmamızdaki RDW yüksekliği, Kamal ve ark'nın çalışmasında da gözlenmiştir.

Tablo X. Çalışmamızda ve literatürde $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ genotipine sahip bireylerdeki hematolojik parametreler.

Literatür	N	Hb	MCV	MCH	RBC	RDW
Çalışmamız	7	11.61±1.55	59.94±3.01	19.38±0.94	5.98±0.74	16.62±1.66
Onay ve ark.(35)	24	11.40±1.43	65.66±5.75	17.37±3.62	5.33±0.35	-
Al-Allawi ve ark.(29).	14	12.96±1.22	70.76±2.53	22.51±0.87	-	-
Bozdoğan ve ark. (34)	102	10.8±1.9	63.7±7.4	20.5±2.7	5.3±0.7	-
Güvenç ve ark (33).	26	-	68.85±9.15	24.77±6.40	-	-
Çelik ve ark. (31)	11	9.68±1.12	58.14±6.52	19.48±2.75	5.20±0.66	-
Jassim ve ark. (39)	10	11,09±2,3	73,4±5,9	23,6 ± 1,7	4,71±1,1	-
Kamal ve ark. (24)	12	11.8±1.1,	66.5±2.8	20.9±0.8,	5.6±0.6	16.0±1.7

El-Kalla ve Baysal (58)alfa globin sayısında azalmanın MCV değerinde anlamlı düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir. MCV ve MCH değeri en düşük olarak $-\alpha^{3.7}/--^{MED}$ mutasyonu olan kişilerde bulunurken, en yüksek değerler $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ mutasyonu olan kişilerde gözlenmiştir.

Alibakhski ve ark. (30) en yüksek MCV ve MCH değerlerini $-\alpha^{4.2}$ ve $-\alpha^{3.7}$ heterozigot delesyon varlığında (sırasıyla 78.8±2.8 ve 24.8±1.6; 77.6±4.5 ve 25.8±1.9), en düşük MCV ve MCH değerini (65.2±1.1 ve 19.3±0.4) α^{-5nt} homozigotluk durumunda saptamışlardır. Çalışmamızda en yüksek MCV ve MCH değerini $\alpha 2^{PolyA-2}/\alpha\alpha$ genotipi olan hastada (78.10 ve 23.10) en düşük MCV ve MCH değerini $\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$ olan hastada (59 ve 18.90) saptadık. $\alpha 2^{IVS1(-5nt)}/\alpha 2^{IVS1(-5nt)}$ mutasyonu olan hastanında MCV'si 18.90 idi.

Çelik ve ark.(31)ortalama Hb, MCV, MCH ve RBC düzeyini sırasıyla $\alpha\alpha/--^{MED}$ mutasyonu saptanan 10 kişide 11.25±0.21, 64.70±3.39 22.80±3.39, 5.01±0.84; $\alpha 2^{-5nt}\alpha/\alpha 2^{-5nt}\alpha$ mutasyonu olan 4 kişide 9.42±0.99, 62.80±2.50, 19.50±0.63, 4.83±0.39; $-\alpha^{3.7}/-\alpha 2^{-5nt}$ α saptanan 3 kişide 11.10±0.14, 64.20±0.27, 20.90±0.28, 5.21±0.08; $-\alpha^{3.7}/-\alpha 2^{Poly A2}$ saptanan 2 kişide 13.15±0.35, 67.90±0.56,21.40±0.14, 6.13±0.23; $\alpha\alpha/\alpha 2^{-5nt}\alpha$ saptanan 2 kişide 11.40±0.70, 71.90±2.96, 25.00±1.69, 4.57±0.14; $\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$ saptanan 3 kişide 14.96±0.95,78.16±0.35, 27.63±0.70, 5.40±0.20; $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{20.5}$ saptanan 1 kişide 11.20, 65.60,

21.70, 33.00, 5.18; $-\alpha^{3.7}/--^{MED}$ saptanan 1 kişide 10.60, 62.60, 20.60, 5.17; $\alpha\alpha/\alpha 2^{Poly A2}$ saptanan 1 kişide 9.60, 77.80, 24.70, 3.88; $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ saptanan 1 kişide 12.30, 76.20, 25.90, 4.86; $\alpha\alpha/--^{FIL}$ saptanan 1 kişide 9.80, 73.60, 24.3, 4.8; $\alpha\alpha/\alpha 2^{Poly A1}$ saptanan 1 kişide 7.80, 65.60, 20.70, 3.77 bulmuşlardır.

Güvenç ve ark (33). heterozigot alfa talasemi mutasyonlarında hematolojik indekslerde hafif düzeyde değişiklik saptamışlardır. MCV ve MCH ortalamasını sırasıyla $--^{MED}/\alpha\alpha$ saptanan 34 kişide 63.45 ± 3.05 ve 20.20 ± 0.90 , $--^{20.5}/\alpha\alpha$ saptanan 15 kişide 70.05 ± 6.05 , 23.30 ± 1.70 ; $-\alpha^{3.7}/--^{MED}$ saptanan 9 kişide 62.10 ± 1.15 ve 18.95 ± 0.55 ; $\alpha^{PA-2}/\alpha\alpha$ saptanan 9 kişide 75.50 ± 2.85 ve 25.80 ± 1.90 ; $\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}/\alpha\alpha$ saptanan 5 kişide 71.40 ± 8.10 ve 23.42 ± 3.95 olarak bulunmuştur. Ayrıca MCV, MCH ve MCHC değerleri fonksiyonel alfa globin sayısı ile korele bulunmuştur.

Bozdoğan ve ark. (34)'nın çalışmasında en düşük MCV değeri (58.1 ± 5.0) $--^{MED}/-\alpha^{3.7}$ genotipinde gözlenirken, en yüksek MCV değeri (74.9 ± 7.6) $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ genotipindeki bireylerde gözlenmiş ve MCH ve MCHC değerlerinin de benzer şekilde olduğu ifade edilmiştir. Delesyonel olmayan mutasyonlu hastaların hematolojik parametreleri (Hb, RBC, MCV, MCH, MCHC) ile delesyonel mutasyonu olan hastaların hematolojik parametreleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. En sık rastlanan 3 delesyonel genotipin ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$, $--^{20.5}/\alpha\alpha$, $--^{MED}/\alpha\alpha$) ortalama Hb, RBC, MCV, MCH ve MCHC düzeyleri sırasıyla $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ genotipine sahip hastalarda 10.8 ± 1.8 , 5.3 ± 0.7 , 63.7 ± 7.4 , 20.5 ± 2.7 , 32.2 ± 1.3 ; $--^{20.5}/\alpha\alpha$ genotipine sahip hastalarda 11.9 ± 1.1 , 5.8 ± 0.5 , 65.5 ± 3.5 , 20.8 ± 1.3 , 31.7 ± 1.1 , $--^{MED}/\alpha\alpha$ genotipine sahip hastalarda 11.9 ± 1.2 , 5.7 ± 0.58 , 65.5 ± 2.9 , 21.1 ± 1.2 , 32.2 ± 1.1 saptanmış ve $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ile $--^{20.5}/\alpha\alpha$ karşılaştırıldığında Hb, MCV ve RBC; $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ile $--^{MED}/\alpha\alpha$ karşılaştırıldığında Hb, MCV ve RBC arasında, $--^{MED}/\alpha\alpha$ ile $--^{20.5}/\alpha\alpha$ karşılaştırıldığında yalnızca MCHC düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır.

Ahmad ve ark.(47) ortalama Hb, RBC, MCV, MCH, MCHC ve Hb F düzeylerini sırasıyla sessiz taşıyıcılarda 21.0 ± 15.7 , 4.78 ± 0.72 , 17.9 ± 6.1 , 75.8 ± 8.5 , 24.2 ± 3.6 , 31.8 ± 2.2 , 1.9 ± 4.5 ; α^+ taşıyıcılarda 10.8 ± 1.7 , 4.97 ± 0.81 , 17.8 ± 5.4 , 69.8 ± 8.1 , 21.8 ± 2.4 , 31.4 ± 2.2 , 2.9 ± 13.1 ; α^0 taşıyıcılarda 11.3 ± 1.7 , 5.32 ± 0.81 , 18.0 ± 4.9 , 67.8 ± 7.2 , 21.2 ± 2.1 , 31.5 ± 3.1 , 0.9 ± 2.6 saptamışlar ve RBC düzeyi ortalamasının α^0 traitli bireylerde yüksek, sessiz taşıyıcılarda ve α^+ taşıyıcılarda normal olduğunu belirtmişlerdir.

Lin ve ark. (59) α^0 talasemi genotiplerinin hematolojik parametreleri arasında fark bulamamışlardır.

Al-Allawi ve ark. (29) --^{MED-I}/ $\alpha\alpha$ ve $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ile $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ hematolojik parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu belirtmişlerdir.

Onay ve ark. $\alpha^{PA-2}/\alpha\alpha$ ve $\alpha^{PA-1}/\alpha\alpha$ genotipi taşıyanlar hastalarda belirgin MCV düşüklüğü (sırasıyla 55.80 ± 10.20 ; 54.10 ± 4.33) olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda $\alpha^{PA-2}/\alpha\alpha$ genotipine sahip bir hasta vardı ve MCV'si 78.10 idi. $\alpha^{PA-1}/\alpha\alpha$ genotipine sahip 4 hastanın MCV ortalaması ise 68.32 ± 3.43 idi.

Akhavan-Niaki ve ark. (28) bir defektif alfa globin defekti olan hastaların MCV, MCH, MCHC, HbA2 ve Hb F düzeyleri arasında ve iki defektif alfa globin defekti olan hastaların aynı parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadıklarını; tek gende bozukluk olan hastalarla 2 fonksiyonel alfa geni olan hastaların MCV ve MCH değerleri karşılaştırıldığında ise ikinci grupta MCV ve MCH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüklük olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda tek ve çift gen delesyonu grupları arasında Hb (11.86 ± 1.67 vs 10.93 ± 0.83), RBC (5.62 ± 0.77 vs 5.59 ± 0.31) ve RDW (16.38 ± 2.53 vs 17.36 ± 3.18) değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, MCV (66.78 ± 7.38 vs 60.69 ± 3.11), MCH (21.40 ± 2.51 vs 19.30 ± 1.11) ve HbA2 (2.52 ± 0.34 vs 2.16 ± 0.39) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p değeri sırasıyla <0.001 , <0.001 , $=0.006$). Bu sonuçlar bize MCV, MCH ve HbA2 değerlerinin alfa talasemi düşünülen hastalarda delesyona uğrayan gen sayısı hakkında fikir verebileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak, Aydın ili ve çevresinde alfa talasemili hastalarda mutasyon tipinin ve dağılımının bilinmesi prenatal tanı ve hasta bakımı için daha iyi danışmanlık yapılmasını sağlayacağı gibi Türkiye'nin alfa talasemi mutasyon haritasına da katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu çalışmadaki veriler hastaların klinik takiplerindeki verilerle birleştirilirse ve olgu serisi genişletilirse hastalığın genetik geçişinin moleküler mekanizması ile fenotip arasındaki bağlantı hakkında çok daha yararlı bilgiler elde edilecektir.

SONUÇLAR

1. Elli iki alfa talasemili çocukta (31'i erkek, 21'i kız) 12 farklı genotip ve 11 farklı mutasyon saptadık.
2. En sık rastladığımız 4 genotip sırasıyla $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (%40.4), $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ (%13.5), $--^{20,5}/\alpha\alpha$ (%11,5) ve $--^{MED}/\alpha\alpha$ (%9.6) idi.
3. En sık rastladığımız 4 allel sırasıyla $-\alpha^{3,7}$ (%33.65), $--^{20,5}$ (%7.68), $--^{MED}$ (%4.8) ve $\alpha 2^{PolyA-1}$ (%3.84) idi.
4. Hastaların ortalama Hb düzeyi 11.64 ± 1.59 gr/dl (dağılım, 8.70-15.60 gr/dl), ortalama RBC düzeyi 5.65 ± 0.51 (dağılım, 4.46-7.25), ortalama MCV düzeyi 65.46 ± 7.15 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH düzeyi 20.96 ± 2.44 pg (dağılım, 14.30-26.30), ortalama RDW düzeyi 16.20 ± 2.16 (dağılım, 12.20-23.00), HbA2 düzeyi $\%2.46 \pm 0.37$ (dağılım, 1.62-3,10) idi.
5. En sık rastladığımız mutasyon olan alfa 3.7 heterozigot tek gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 11.95 ± 1.49 gr/dl (dağılım, 8.70-15.30 gr/dl), ortalama RBC düzeyi 5.48 ± 0.51 (dağılım, 4.46-6.23), ortalama MCV düzeyi 68.74 ± 8.00 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH düzeyi 22.09 ± 2.84 pg (dağılım, 14.50-26.30), ortalama RDW düzeyi 16.31 ± 2.84 (dağılım, 12.20-23.00), HbA2 düzeyi $\%2.53 \pm 0.37$ (dağılım, 1.65-3,05) idi.
6. Elliiki hastada gözlenen mutasyonların 45'i (%86.54) delesyonel, 7'si (%13.46) delesyonel olmayan mutasyondur. Delesyonel mutasyonların 34'ü tek gen delesyonu, 11'i çift gen delesyonu idi.
7. Tek gen delesyonu mevcut olan hastaların ortalama Hb düzeyi 11.86 ± 1.67 gr/dl (dağılım, 6.60-15.60), ortalama RBC düzeyi 5.62 ± 0.77 (dağılım, 2.51-7.25), ortalama MCV düzeyi 66.78 ± 7.38 fl (dağılım, 44.80-81.70), ortalama MCH düzeyi 21.40 ± 2.51 pg (dağılım, 14.50-26.30), ortalama RDW düzeyi 16.38 ± 2.53 (dağılım, 14.55-15.80), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.52 \pm 0.34$ (dağılım, %1.65-3.10) idi.
8. Çift gen delesyonu saptanan olguların ortalama Hb düzeyi 10.93 ± 0.83 gr/dl (dağılım, 10.10-13.00), ortalama RBC düzeyi 5.59 ± 0.31 (dağılım, 5.10-6.37), ortalama MCV düzeyi 60.69 ± 3.1 fl (dağılım, 54.70-65.50), ortalama MCH düzeyi 19.30 ± 1.11 pg (dağılım, 17.60-21.00), ortalama RDW düzeyi 17.36 ± 3.18 (dağılım, 14.70-26.40), ortalama HbA2 düzeyi $\%2.16 \pm 0.39$ (dağılım %1.62-3.01) idi.

9. Tek ve çift gen delesyonu grupları arasında Hb, RBC ve RDW değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken (p değeri sırasıyla 0.096, 0.476, 0.213). MCV, MCH ve HbA2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p değeri sırasıyla <0,001 <0,001, =0,006).
10. Hemoglobin düzeyi 52 hastanın 27'sinde (%51.92) normal, 25'inde (%48.08) düşüktü.
11. Mikrositoz (MCV düşüklüğü) hastaların 48'inde(%92.31) mevcuttu.
12. Hipokromi (MCH düşüklüğü) tüm hastalarda mevcuttu.
13. RBC yüksekliği 50 hastada (%96.15) mevcuttu.
14. RDW 47 hastada (%90.38) yüksek, 5 hastada (%9.62) normal saptandı.
15. En sık rastladığımız- $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip 21 hastanın 8'inde anemi, 18'inde mikrositoz, hepsinde hipokromi saptandı. RBC yüksekliği 20 hastada mevcuttu. RDW 18 hastada yüksek, 3 hastada ise normal saptandı.
16. Çalışmamızda bulduğumuz HBA1: c328 del C heterozigot mutasyon (HbVar ID: 2724;HGVS name: HBA1:c.328delC) Ülkemizde daha önce tanımlanmamış bir mutasyondur.
17. Çalışmamızda bir hastada rastladığımız alfa2 geninde HBA2:c.93_95+2 del GAGGT mutasyonu daha önce tanımlanmamış ve veri tabanında olmayan bir genomik değişimdir. Kodon 30-31 ve intron 1 in kırılma bölgesini etkilediği için patolojik sonuçları olması öngörülmektedir. Ancak yeni bir mutasyon olarak değerlendirilebilmesi için aile taraması ile bu değişimi taşıyan başka kişilerin olup olmadığının değerlendirilmesi gerekecektir.
18. Çalışmamızda en yüksek MCV ve MCH değerini $\alpha 2^{\text{PolyA-2}}/\alpha\alpha$ genotipi olan hastada (78.10 ve 23.10) en düşük MCV ve MCH değerini $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$ olan hastada (59 ve 18.90) saptadık. $\alpha 2^{\text{IVS1(-5nt)}}/\alpha 2^{\text{IVS1(-5nt)}}$ mutasyonu olan hastasında MCV'si 18.90 idi.

ÖZET

AMAÇ

Aydın ili ve çevresinde yaşayan ve alfa talasemi taşıyıcılığı tanısı konulan çocuklarda mutasyon tipini belirlemek ve saptanan mutasyonların hematolojik parametreler üzerine olan etkisini değerlendirmek.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi Polikliniği'nde 1 Ocak 2010 ile 30 Haziran 2015 yılları arasında demir eksikliği anemisi ve beta talasemi taşıyıcılığı dışlanmış (ferritin normal; Hb A2 <%3.5) ve alfa talasemi taşıyıcılığı düşünülüp tanıları mutasyon analizi ile konfirme edilen 52 hasta çalışmaya alındı. Alfa globin genindeki mutasyonlar reverse hibridizasyon prensibine dayalı ViennaLab α -globin StripAssay™ ticari kiti kullanılarak tespit edildi. Stript analizi ile saptanamayan mutasyonlar için 50 hastada Antalya Genetik Laboratuvarı'nda alfa 1 ve alfa 2 genlerinde DNA dizi analizi ile mutasyon taraması yapıldı. Hastaların hemogramları Mindray marka BC-6800 numaralı kan sayımı cihazıyla, hemoglobin elektroforezleri ise Aqilent marka 1100 seri numaralı cihazda HPLC yöntemiyle çalışıldı.

BULGULAR

Elli iki alfa talasemili çocukta (31'i erkek, 21'i kız; yaş ortalaması 7.62±5.01) 12 farklı genotip ve 11 farklı mutasyon saptadık. En sık rastladığımız 4 genotip ve 4 allel sırasıyla - $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (%40.4), - $\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ (%13.5), -- $^{20,5}/\alpha\alpha$ (%11.5), -- $^{MED}/\alpha\alpha$ (%9.6) ve - $\alpha^{3,7}$ (%33.65), -- 20,5 (%7.68), -- MED (%4.8), $\alpha 2^{PolyA-1}$ (%3.84) idi. Mutasyonların 45'i (%86.54) delesyonel, 7'si (%13.46) nondelesyoneldi. Delesyonel mutasyonların 34'ü tek gen delesyonu, 11'i çift gen delesyonu idi. Tek ve çift gen delesyonu grupları arasında hemoglobin, kırmızı küre ve RDW düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, MCV (66.78±7.38 vs 60.69±3.1 fl), MCH (21.40±2.51 vs 19.30±1.11 pg) ve HbA2 (%2.52±0.34 vs %2.16±0.39) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (p değeri sırasıyla <0,001, <0,001, =0,006). Anemi %48.08, mikrositoz %92.31, hipokromi %100, kırmızı küre yüksekliği %96.15, RDW yüksekliği %90.38 hastada; En sık rastladığımız - $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotipine sahip 21 olguda ise anemi %38.1, mikrositoz %85.71, hipokromi %100, kırmızı küre yüksekliği %95.24 ve RDW yüksekliği %85.71 oranında saptandı. HBA1: c328 del C heterozigot mutasyonu ülkemizde daha önce tanımlanmamış bir mutasyondur. HBA2: c.93_95+2 del GAGGT mutasyonu daha önce tanımlanmamış ve veri tabanında olmayan bir genomik değişimdir.

SONUÇ

Aydın ili ve çevresinde alfa talasemili hastalarda mutasyon tipinin ve dağılımının bilinmesi prenatal tanı ve hasta bakımı için daha iyi danışmanlık yapılmasını sağlayacağı gibi Türkiye'nin alfa talasemi mutasyon haritasına da katkı sağlayacaktır. Tek ve çift gen delesyonu ayırımında MCV, MCH ve HbA2 düzeyleri yol gösterici olabilir. RDW demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısında uygun bir gösterge değildir.

Anahtar sözcükler: Alfa talasemi, mutasyon, hemoglobinopati, anemi, çocuk

SUMMARY

OBJECTIVE

To determine the type of mutation in the children who have been diagnosed as α thalassemia carriers living in Aydin and its peripheric regions and to evaluate the effect of this mutations on haematologic parameters.

MATERIALS AND METHODS

Fifty two patients who have been suspected of alfa thalassemia carriage, then confirmed with mutation analysis with exclusion of iron deficiency anemia ve beta thalassemia (Normal ferritin level; HbA2 <%3.5) at Adnan Menderes University Pediatric Hematology Department between January 1st 2010 and June 30th 2015 enrolled in the study. The mutations in alfa globin gene have been detected using ViennaLab α -globin StripAssay with reverse hybridization principle. The mutations which can not be detected with StripAssay, a mutation screening for alfa 1 and alfa 2 genes in DNA sequence analysis has been performed in 50 patients at Antalya Genetics Laboratory. Mindray BC-6800 has been used for CBC and Aqilent 110 has been used for hemoglobin electrophoresis with HPLC method.

RESULTS

We have detected 12 different genotypes and 11 different mutations in 52 alfa thalassemia patients (31 boys, 21 girls; median age 7.62 ± 5.01). The most frequent 4 geontypes and 4 allells are $\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (40.4%), $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ (13.5%), $--^{20,5}/\alpha\alpha$ (11,5%), $--^{MED}/\alpha\alpha$ (9.6%) and $-\alpha^{3,7}$ (33.65%), $--^{20,5}$ (7.68%), $--^{MED}$ (4.8%), $\alpha 2^{PolyA-1}$ (3.84%) respectively. Forty five of the mutations (%86.54) were deletional whereas, 7 of them were non-deletional. 34 of deletional mutations were single-gene deletions, and 11 of them were double-gene deletions. There was no statistical significant difference between single and double gene deletion groups in haemoglobin, red cells and RDW levels whereas a statistically significant difference has been detected in MCV (66.78 ± 7.38 vs 60.69 ± 3.1 fl), MCH (21.40 ± 2.51 vs $19,30 \pm 1.11$ pg) ve HbA2 ($\%2.52 \pm 0.34$ vs $\%2.16 \pm 0.39$) levels ($p < 0,001$, $< 0,001$, $= 0,006$, respectively). Anemia 48,08%, microcytosis 92.31%, hypochromia 100%, red blood cell elevation 96.15%, RDW elevation 90.38% was detected proportionally in our patients. In 21 patients with the most frequent $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ genotype, anemia 38.1%, microcytosis 85.71%, hypochromia 100%, red blood cell elevation 95.24% and RDW elevation 85.71% was detected respectively. HBA1:c328 del C heterozygotic mutation has been detected for the first time in our country.

HBA2:c.93_95+2 del GAGGT mutation has been detected for the first time and can not be found in database around the world.

CONCLUSION

Acknowledgement of the type and the widespread of the mutations in alfa thalassemia patients in Aydin and peripherals will be of great value in prenatal diagnostic and consultancy care and also will be a valuable contribution in Turkey's alfa thalassemia mutation map. MCV, MCH and HbA2 levels can be useful in differentiation of single and double gene deletions. RDW is not an appropriate tool in differential diagnosis of iron deficiency.

Key words: Alfa thalassemia, mutations, hemoglobinopathy, anemia, children

KAYNAKLAR

1. Karakaş Z. Alfa talasemi. Hematolog 2014;4:117-33.
2. Koçak Ü. Hemoglobinopatilerde genotip fenotip ilişkisi. Hematolog 2014;4: 55-65.
3. Thom CS, Dickson CF, Olson JS, Gell DA, Weiss MJ. Normal and abnormal hemoglobins. In: Orkin SH, Fisher DE, Ginsburg D, Look AT, Nathan DG (eds). Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood. Eighth ed., Philadelphia: Elsevier, 2015: 630-74.
4. Kutlar F. Hemoglobinopatilerin laboratuvar tanısı. Hematolog 2014;4:45-54.
5. Özyüncü Ö, Beksaç M.S. Talasemi ve hemoglobinopatilerde prenatal tanı. Canatan D, Aydınok Y (eds). Talasemi ve Hemoglobinopatiler: tanı ve tedavi, Birinci baskı, Antalya: Retma Matbaa Ltd, 2007: 73-81.
6. Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta thalassemia. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3924-8.
7. Sankaran VG, Nathan DG, Orkin SH. Thalassemyias. In: Orkin SH, Fisher DE, Ginsburg D, Look AT, Nathan DG (eds). Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood. Eighth ed., Philadelphia: Elsevier, 2015: 715-69.
8. Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano PC, Gulbis B, Hopmeier P, Russo DL, Romao L, Theodorsson E. Epidemiology of hemoglobin disorders in Europe: an review. Scand J Clin Invest 2007;67:39-70.
9. Vergin C. Dünyada hemoglobinopatilerin epidemiyolojisi. Hematolog 2014;4:1-10.
10. Lorey F. Asian immigration and public health in California: thalassemia in newborns in California. J Pediatr Hematol Oncol 2000;22:564-6.
11. Pearson HA, Cohen AR, Giardina PJ, Kazazian HH. The changing profile of homozygous beta-thalassemia: demography, ethnicity, and age distribution of current North American patients and changes in two decades. Pediatrics 1996;97:352-6.
12. Arcasoy A. Türkiye'de thalassemia taşıyıcı sıklığı. Thalassemia Derneği-1. Ankara Üniversitesi Basımevi 1991:11-12.
13. Canatan D, Keser İ, Delibaş S, Aracı A. Prof. Dr. Muzaffer Aksoy anısına Antalya İbradı'da talasemi ve hemoglobinopati eğitim ve taraması. In: Canatan D, Kılınç Y (eds), 6. Uluslararası Talasemi Yaz Okulu. 18-23 Nisan 2013:17-21.
14. Canatan D, Oğuz N, Güvendik İ, Yıldırım S. The incidence of alpha-thalassemia in Antalya, Turkey. Turk J Haematol 2002;19:433-4.

15. Kılınç Y, Kümi M, Gürgey A, Altay Ç. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, G6PD enzim eksikliği ve HbS sıklığının araştırılması. Doğa Tıp ve Ecz Der 1986;10:162.
16. Guvenc B, Canataroglu A, Unsal C, Yildiz SM, Turhan FT, Bozdogan ST, Dincer S, Erkman H. β -thalassemia mutations and hemoglobinopathies in Adana, Turkey: results from a single center study. Arch Med Sci 2012;8:411-4.
17. Fei YJ, Kutlar F, Harris HF 2nd, Wilson MM, Milana A, Sciacca P, Schiliro G, Masala B, Manca L, Altay C, et al. A search for anomalies in the zeta, alpha, beta, and gamma globin gene arrangements in normal black, Italian, Turkish, and Spanish newborns. Hemoglobin 1989;13:45-65.
18. Özsoylu Ş, Malik SA. Incidence of alpha thalassemia in Turkey. Turk J Pediatr 1982;24:235-44.
19. Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. Genet Med 2011;13(2):83-8.
20. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis 2010;5:13.
21. Özkınay F. Hemoglobinopatilerde genetik patoloji ve moleküler tanı yöntemleri. Hematolog 2014;4:30-44.
22. Chinchang W, Viprakasit V, Pung-amritt P, Tanphaichitr VS, Yenchitsomanus P. Molecular analysis of unknown beta globin gene mutations using polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with beta thalassemias and beta globin variants. Clin Biochem 2005;38:987-96.
23. Basak AN. Talasemi moleküler genetigi. Türk Hematoloji Derneği temel moleküler hematoloji kursu 12-13 Mart 2005; 99-106.
24. Kamal M, Abu-Sirriya S, Abu-Dayya A, Al-Khatib H, Abu-Ramadan H, Petrou M, Amer A, Badii R, Kleanthous M. The molecular basis of α -thalassemia in the Qatari pediatric population. Hemoglobin 2015;13:1-5.
25. Baysal E. α -thalassemia syndromes in the United Arab Emirates. Hemoglobin 2011;35(5-6):574-80.
26. Hellani A, Fadel E, El-Sadadi S, El-Sweilam H, El-Dawood A, Abu-Amro KK. Molecular spectrum of alpha-thalassemia mutations in microcytic hypochromic anemia patients from Saudi Arabia. Genet Test Mol Biomarkers 2009;13(2):219-21.

27. Sankar VH1, Arya V, Tewari D, Gupta UR, Pradhan M, Agarwal S. Genotyping of alpha-thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from North India. *J Appl Genet* 2006;47(4):391-5.
28. Akhavan-Niaki H, Youssefi Kamangari R, Banihashemi A, Kholghi Oskooei V, Azizi M, Tamaddoni A, Sedaghat S, Vakili M, Mahmoudi Nesheli H, Shabani S. Hematologic features of alpha thalassemia carriers. *Int J Mol Cell Med* 2012;1(3):162-7.
29. Al-Allawi NA, Jalal SD, Rasheed NS, Bayat N, Imanian H, Najmabadi H, Faraj A. The spectrum of α -thalassemia mutations in the Kurdish population of Northeastern Iraq. *Hemoglobin* 2013;37(1):56-64.
30. Alibakhshi R, Mehrabi M, Omidniakan L, Shafieenia S. The spectrum of α -thalassemia mutations in Kermanshah province, west Iran. *Hemoglobin* 2015;19:1-4.
31. Celik MM, Gunesacar R, Oktay G, Duran GG, Kaya H. Spectrum of α -thalassemia mutations including first observation of --(FIL) deletion in Hatay Province, Turkey. *Blood Cells Mol Dis* 2013;51(1):27-30.
32. Oner C, Gürgey A, Oner R, Balkan H, Gümrük F, Baysal E, Altay C. The molecular basis of Hb H disease in Turkey. *Hemoglobin* 1997;21(1):41-51.
33. Guvenc B, Yildiz SM, Tekinturhan F, Dincer S, Akyuzluer I, Okten S, Erkman H. Molecular characterization of alpha-Thalassemia in Adana, Turkey: A single center study. *Acta Haematol* 2010;123(4):197-200.
34. Bozdogan ST, Yuregir OO, Buyukkurt N, Aslan H, Ozdemir ZC, Gambin T. Alpha-thalassemia mutations in adana province, southern Turkey: genotype-phenotype correlation. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015;31(2):223-8.
35. Onay H, Aykut A, Karaca E, Durmaz A, Solmaz AE, Çoğulu Ö, Aydınok Y, Vergin C, Özkınay F. Molecular spectrum of α -globin gene mutations in the Aegean region of Turkey: first observation of three α -globin gene mutations in the Turkish population. *Int J Hematol* 2015;102(1):1-6.
36. Aldemir Ö, İzmirli M. Hataydaki α -talasemi genotipleri ve α -talasemi genotip frekansı. *Abant Med J* 2014;3:233-6.
37. Karakaş Z, Koç B, Temurhan S, Çilsaat G, Gencay G, Aydın F. Alpha thalassemia mutations in selected cases: Is it possible low cost screen? 13th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies. *Thalassemia International Federation Abu Dhabi*, October 2013;311:69.

38. Ünal Ş, Gümrük F. The hematological and molecular spectrum of α -thalassemias in Turkey: The Hacettepe Experience. *Turk J Haematol* 2015;32(2):136-143.
39. Jassim N, Al-Arrayed S, Gerard N, et al. Molecular basis of α -thalassemia in Bahrain. *Bahrain Med Bull* 2001;23(1):3-7.
40. Huang SW, Xu Y, Liu XM, Zhou M, Li GF, An BQ, Su L, Wu X, Lin J. The prevalence and spectrum of α -thalassemia in Guizhou province of south China. *Hemoglobin* 2015;39(4):260-3.
41. Zhang J, Zhu BS, He J, et al. The spectrum of α - and β -thalassemia mutations in Yunnan Province of Southwestern China. *Hemoglobin* 2012;36(5):464-73.
42. Wu WQ, Jing J, Cai J, et al. Analysis of α and β thalassemia mutations in Hunan province. *Chin J Birth Health* 2007;15(11):43-4.
43. Zheng CG, Liu M, Du J, et al. Molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations detected in the population of Guangxi Zhuang Autonomous Region, People's Republic of China. *Hemoglobin* 2011;35(1):28-39.
44. Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassemia in Guangdong Province: Implications for the future health burden and population screening. *J Clin Pathol*. 2004;57(5):517-22.
45. Yao XY, Yu J, Chen SP, et al. Prevalence and genetic analysis of α -thalassemia and β -thalassemia in Chongqing area of China. *Gene* 2013;532(1):120-4.
46. Sutcu R, Aylak F, Kocak H, Sipahi T, Vural H, Delibas N. The investigation of distribution of hereditary α -thalassemia mutations in Isparta reservoir. *Eur J Basic Med Sci* 2011;1:28-32.
47. Ahmad R, Saleem M, Aloysious NS, Yelumalai P, Mohamed N, Hassan S. Distribution of α thalassaemia gene variants in diverse ethnic populations in malaysia: data from the institute for medical research. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):18599-614.
48. Cürük MA. Hb H (β 4) disease in Çukurova, southern Turkey. *Hemoglobin* 2007;31:265-271.
49. Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, Kyrri A, Kalogirou E, Angastiniotis M, Ioannou P, Huisman TH. α -thalassaemia in the population of Cyprus. *Br J Haematol* 1995;89:496-9.
50. Çürük MA, Genç A, Huseynova P, Zeren F, Aksoy K. Çukurova'da α talasemi genotipleri ve HB H hastalığı. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2007;3:17-23.

51. Nainggolan IM, Harahap A, Setianingsih I. Hydrops fetalis associated with homozygosity for Hb Adana [a59(E8)Gly! Asp (a2)]. Hemoglobin 2010;34(4):394-401.
52. Aksu T, Yaralı N, Bayram C, Fettah A, Avci Z, Tunç B. Homozygosity for HBA1: c.179G > A: Hb Adana in an infant. Hemoglobin 2014;38(6):449-50.
53. Kılınç Y, Kümi M, Gurgey A, Altay Ç. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, G6PD enzim eksikliği ve HbS sıklığının araştırılması. Doğa Tıp ve Ecz D 1986;10:162.
54. Karakaş Z, Koç B, Temurhan S, Çilsaat G, Gencay G, Karaman S. Seçilmiş vakalarda alfa talasemi: daha az maliyetle tarama mümkün mü? In: XXXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi ve VIII. Balkan Day of Hematology, 2013, Abstract 0597.
55. Gurgey A, Altay C, Beksaç MS, Bhattacharya R, Kutlar F, Huisman TH. Hydrops fetalis due to homozygosity for α -thalassemia-1, -(α)-20.5 kb: the first observation in a Turkish family. Acta Haematol 1989;81:169-71.
56. Güzelgöl F, Yalın AE, Kıymet A. Türkiye’de ilk kez gözlenen iki alfa globin mutasyonu: Hb Stanleyville II ve homozigot 5nt delesyonu. Türk Biyokimya Dergisi 2014;39:523-8.
57. Sankar VH, Arya V, Tewari D, Gupta UR, Pradhan M, Agarwal S. Genotyping of alpha-thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from North India. J Appl Genet 2006;47(4):391-5.
58. El-Kalla S, Baysal E. alpha-thalassemia in the United Arab Emirates. Acta Haematol 1998;100:49-53.
59. Lin HJ, Shih MC, Peng CT, Liu TC, Chen KW, Shih HC, Chang JG. Hematological features and molecular lesions of hemoglobin gene disorders in Taiwanese patients. Int J Lab Hematol 2010;32(1 Pt 2):1-7.

EKLER

Ek 1. Etik kurul onayı

 **T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU** 

Sayı : 5698459545/050.04- 366
Konu : Çalışmanız hk.

11/09/2015
AYDIN

Sayın, Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL,
Çocuk Sağ. ve Hast. AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10.09.2015 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 17 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. Nefati KIZILIRMAK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

KARAR 17

Protokol No : 2015/621
Sorumlu Yürütücü : Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL
Çocuk Sağ. ve Hast. AD

Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yusuf Ziya ARAL'ın "Aydın ili ve çevresinde yaşayan alfa talasemi taşıyıcısı çocuklarda mutasyon analizi" başlıklı klinik araştırmasının 11.06.2015 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştı, 09.09.2015 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüldü.

Yapılan değerlendirmede;

Sorumlu yürütücü Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL etik kurul üyesi olduğundan ilgili yasa maddesinde çocuk üzerinde klinik araştırma yapabilmek için ilgili etik kurulda Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanının olması gerektiği göz önüne alınarak Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Yavuz TOKGÖZ geçici üye olarak toplantıya çağrılarak görüşü alınmış ve geçici üye olarak imzaya açılmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Sonuçta klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.3'ün son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), BGOF (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmelidir.) ve ORF (Olgu Raporu Formu/Anketi)] lerin gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69
Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/gork/> e-posta: goetik@adu.edu.tr