Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2014; 39(4):523–528
doi: 10.5505/tjb.2014.31967

Araştırma Makalesi [Research Article]

Yayın tarihi 5 Aralık 2014 © TurkJBiochem.com
[Published online December 05, 2014]

Türkiye'de ilk kez gözlenen iki alfa globin mutasyonu: Hb Stanleyville II ve homozigot 5nt delesyonu

[The first observation of two alpha globin mutations in Turkey: Hb Stanleyville II and a homozygous 5nt deletion]

Figen Güzelgül[1],
Ali Erdinç Yalın[2],
Kıymet Aksoy[1]

[1]Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana;
[2]Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Figen Güzelgül

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Türkiye
Telefon: +90 322 3386060/3466
Faks: +90 322 3386943
E-posta: figenguzelgul@gmail.com

Kayıt Tarihi: 26 Ağustos 2014; Kabul Tarihi: 03 Kasım 2014
[Registered: 26 August 2014; Accepted: 03 November 2014]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada hemoglobinopati sıklığının yüksek olduğu Çukurova Bölgesinde geleneksel yöntemlerle belirlenemeyen mutasyonların, DNA Dizi Analizi ile belirlenerek doğum öncesi tanıya katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

Metod: Çukurova Üniversitesi Doğum Öncesi Tanı Merkezine başvuruda bulunan iki ailenin bireylerinden alınan kan örneklerinin hematolojik verileri incelenmiştir. Hemoglobin tiplendirilmesi selüloz asetat kağıdı elektroforezi ve HPLC ile yapılmıştır. Olguların DNA'ları otomatik DNA izolasyon cihazı ile elde edilmiştir. Hemoglobin mutasyonlarının belirlenmesinde Mikroarray, RFLP, ARMS ve Gap-PCR moleküler yöntemleri kullanılmıştır. Geleneksel yöntemlerle belirlenemeyen mutasyonların tiplendirilmesi DNA Dizi Analizi yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: Rutin mutasyon analizi için başvuruda bulunan bir olguda Türkiye'de ilk kez gözlenen α-globin genindeki 5nt delesyonun [α2 IVS-1 134.-138. nt (TGAGG)] homozigot formu DNA Dizi Analizi ile belirlenmiştir. Olgunun ailesinin (on iki olgu) DNA'ları Gap-PCR ve DNA Dizi Analizi ile incelendiğinde yedi olgunun 5nt delesyonunu heterozigot olarak taşıdığı, bir olgunun α-globin geninin 20.5 kb delesyonu taşıdığı ve dört olgunun herhangi bir mutasyon taşımadığı gözlenmiştir. Doğum öncesi tanı için başvuruda bulunan diğer bir ailede ise Türkiye'de ilk kez gözlenen α-globin zincirinin anormal hemoglobini olan Hb Stanleyville II'i [α78 (EF7) Asn→ Lys (AAC→AAA)] ve α globin geninde 3.7 kb'lık delesyonel mutasyonunu birlikte taşıdığı belirlenmiştir. Ailenin on bir ferdinin DNA örnekleri Mikroarray, ARMS, RFLP, Gap-PCR ve DNA Dizi Analizi ile mutasyon tiplendirilmesi yapıldığında iki olgunun Hb Stanleyville II mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı, beş olgunun 3.7 kb'lık delesyonu heterozigot olarak taşıdığı, bir olgunun β-globin geninde IVS-1-110 (G→C) mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı ve üç olgunun herhangi bir mutasyonu taşımadıkları gözlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez gözlenen iki mutasyon tipi tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alfa talasemi, Hb Stanleyville II, hemoglobin, 5nt delesyonu

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması yoktur.

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to contribute prenatal diagnosis in the Çukurova region having high prevalence of hemoglobinopathies by implementing DNA sequencing analysis for the mutations undetectable by conventional methods.

Methods: Hematological parameters of two families applied to Cukurova University Prenatal Diagnosis Center were analyzed. Hb variants were screened by cellulose acetate electrophoresis and by HPLC. DNA samples of cases were isolated using automatic DNA extraction machine. Microarray, RFLP, ARMS and Gap-PCR molecular methodologies carried out for determinations of hemoglobin mutations. Unidentified mutations were resolved by means of DNA Sequence Analysis.

Results: We identified a previously unreported homozygous 5 nt deletional mutation [α2 IVS-1 134.-138. nt (TGAGG)] in Turkey by DNA Sequence Analysis. When we investigated twelve cases of this family by Gap-PCR and DNA Sequence Analysis it is observed that seven cases were heterozygous for 5nt deletion, a case found to be heterozygous 20.5 kb deletional mutation and four cases were found to be having no mutation. In the other family applied for prenatal diagnosis was observed to having Hb Stanleyville II [α2 78 (EF 7) Asn→ Lys (AAC→AAA)] mutation which is also a novel mutaion in Turkey. Mutations of eleven members of this family were determined by ARMS, RFLP, Gap-PCR and DNA Sequence Analysis, resulting in two cases heterozygous Hb Stanleyville II, five cases heterozygous 3.7 kb deletion, a case with heterozygous IVS-1-110 (G→C) mutation on β globin gene and three cases do not have any mutation.

Conclusion: In this study, two types of mutations observed for the first time in Turkey have been identified.

Key Words: Alpha Thalassemia, Hb Stanleyville II, hemoglobin, 5nt Deletion.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Giriş

Hemoglobinopatiler, hemoglobin molekülünün globin zincirlerinin yapısal değişiklikleri veya sentez bozuklukları ile ortaya çıkan otozomal resesif geçiş gösteren kan hastalıklarıdır. Anormal hemoglobinler, hemoglobin molekülünün globin zincirindeki amino asitlerin yer değişikliği, çeşitli füzyon ve mutasyonlardan kaynaklanırken, talasemiler ise hemoglobin molekülünün yapısındaki globin zincirlerinin mutasyonlar sonucu sentezlenememesi ya da yetersiz sentezlenmesi ile karakterize edilmektedir. Alfa globin geninin sentezinin azlığı ya da yokluğu alfa talasemiye (α-talasemi), beta globin geninin sentezinin azlığı ya da yokluğu beta talasemiye (β-talasemi) neden olmaktadır [1].

Alfa talasemi açısından değerlendirildiğinde sağlıklı yetişkin bir bireyin alfa globin genleri αα/αα olarak karakterize edilmektedir. Sıklıkla küçük delesyonlar nedeniyle alfa globin genlerinden bir genin yokluğu sessiz taşıyıcı [$\alpha^{+}\rightarrow$(-α/αα)] olarak ifade edilirken bu olguların kliniği ve hematolojik bulguları normaldir. Bu genotipe sahip olan olgular ılımlı mikrositer ve hipokromik eritrosite ayrıca normal Hb A_2 ve Hb F düzeylerine sahiptirler. Alfa globin genlerinin ikisinin yokluğu Alfa *"trait"* [(α^{+}/$\alpha^{+}\rightarrow$-α/-α) , ($\alpha^{0}\rightarrow$--/αα)] olarak bilinen taşıyıcı olguların mikrositer, hipokromik ve ılımlı anemiye neden olduğu ve α/β globin genlerinin oranları 0.7-0.8 arasında değişmektedir. Üç genin yokluğu Hb H (β4) [$\alpha^{+}/\alpha^{0}\rightarrow$-α/--] olarak ifade edilirken bu hastaların kliniklerinde şiddetli mikrositer, hipokromik, hemolitik anemi ile orta düzeyde sarılık ve hepatosplenomegali gözlenmektedir. Dört alfa geninin yokluğu Hb Bart hidrops fetalis (γ4) [$\alpha^{0}/\alpha^{0}\rightarrow$--/--] olarak karakterizedir. Bu olgularda alfa globin geni üretilmediğinden Hb A2 ve Hb F de sentezlenememektedir. Hemoglobin düzeyleri 3-8 g/dL olan bu olgularda önemli derecede hepatosplenomegali, iskelet ve kardiak bozukluklar, şiddetli anemi, ödem ve karın iltihabı gibi ciddi klinik bulgular gözlenmektedir. Bu hastalar doğumdan önce ya da doğum sonrasında kaybedilmektedir [1-3].

Dünyada bilinen anormal hemoglobin sayısı 1189'dur [4]. Altay ve Akar Türkiye'de gözlemlenen anormal hemoglobin tiplerinin listesini yayınlamışlardır. Buna göre ülkemizde yapılan mutasyon taramalarında en yaygın olarak gözlemlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb O Arap'tır [5-7].

Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre hemoglobinopatinin görülme sıklığı %5'tir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır. Hemoglobinopati tedavisinde kullanılan yöntemler semptomların kısmen azaltılmasını sağlamakta olup radikal bir tedavi tipi henüz geliştirilememiştir. Doğum öncesi tanı hasta doğumunun önüne geçilmesinde en önemli yoldur. Türkiye'de yapılan mutasyon taramaları ve kayıtlı hasta göz önünde bulundurularak 30.12.1993 tarih ve 21804 sayılı Resmi Gazete'de 3960 sayılı Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu çıkartılmıştır. Evlilik öncesi mutasyon taraması testleriyle hasta çocuk doğumunun önlenmesi amacıyla Hemoglobinopati Kontrol Programı başlatılmıştır. Hemoglobinopatilerin önüne geçilmesinin en etkili yolu taşıyıcı bireylerin belirlenmesidir [8]. Bu çerçevede taşıyıcı insidansının yüksek olduğu Adana, Gaziantep, Hatay ve İçel gibi riskli 33 ilde hemoglobinopati tarama merkezleri kurulmuştur.

Ülkemizde sıkça gözlenen α ve β talasemi mutasyon tiplendirilmesi gibi anormal hemoglobinlerin de doğru tanımlanmaları önemlidir. Rutin klinik laboratuvarlarda RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Hb A_2 ve Hb F düzeylerinin kantitatif tayini ve hemoglobin elektroforezi gibi birkaç analizle bazı hemoglobinlerin tiplendirmesi mümkündür. Toplum taramalarında MCV< 80fl ya da MCH<27 pg olduğunda mutasyon analizi için yol gösterici olmaktadır. Hemoglobin elektroforezi ve kantitatif Hb A2 düzeylerinin yüksek olduğu β talasemi taşıyıcıları açısından dikkate alınmaktadır. Çoğunlukla elektroforezleri ve Hb A_2 düzeyleri normal olan α talasemi mutasyon tiplendirilmesinde farklı moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır [9].

Bu çalışmada α globin genindeki mutasyonları belirlemek için Gap-PCR ve DNA Dizi Analizi, β talasemi mutasyon analizi için ARMS yöntemi kullanılmıştır. Ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunu olan hemoglobinopatilerin engellenmesine katkı sağlamak amacıyla ender görülen mutasyon tipleri saptanmaya çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan 30.06.2009 tarihinde onay alınmıştır. Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na doğum öncesi tanı ve mutasyon tiplendirilmesi için başvuruda bulunan iki ailenin ve fertlerinden toplamda yirmi beş olgudan alınan kan örnekleriyle yapılmıştır. Her bir olgudan EDTA'lı tüplerde 5 mL alınan kan örneklerinin tam kan sayımı Coulter Electronics Cell Counter (model T890) ile yapılmıştır. Hemoglobin tiplendirmesinde selüloz asetat elektroforezi ve yüksek yoğunluklu sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır [10,11]. Olguların mikrokolon kromatografisi ile HbA2 düzeyi ve alkali denatürasyonla Hb F düzeyleri belirlenmiştir [12,13]. Çalışmada olguların lökosit DNA'sı Magna Pure LC Otomatik DNA İzolasyon Cihazı (Roche Diagnostics Nederland BV) ile izole edilip +4 derecede saklanmıştır [14]. Bölgemizde yaygın görülen α talasemi mutasyon tipleri Gap-PCR yöntemiyle karakterize edilmiştir [15]. Geleneksel yöntemlerden ARMS ve RFLP metodları β talasemilerin tanısı için kullanılmıştır [16,17]. Ayrıca mikroarray yöntemi ile Hb Stanleyville II içeren ailenin mutasyon taraması yapılmıştır. Bu yöntemlerle tanısı konulamayan olguların mutasyonları DNA Dizi Analizi yöntemiyle çalışılmıştır. DNA Dizi Analizi ile belirlediğimiz 5nt delesyonel mutasyonu [α_2 IVS-1 134.-138. nt (TGAGG)] Gap-PCR yöntemine standardize edilerek olguların taramaları yapılmıştır.

Tablo 1. Alfa globin geninde 5nt delesyona sahip olan ailenin hematolojik verileri ve mutasyon tipleri

No	α-Genotipi	Cinsiyet/Yaş	RBC (10^{12}/L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbF (%)	HbA_2 (%)	Hb Tipi
1	$\alpha^{-5nt}\alpha/\alpha^{-5nt}\alpha$	K/4	6.23	11.20	37.20	59.70	18.00	30.10	0.5	1.3	AH
2	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	E/44	6.01	14.50	47.40	78.80	24.10	30.60	0.8	2.3	AA
3	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	E/33	6.32	14.50	48.30	76.50	23.00	30.10	0.4	2.4	AA
4	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	K/30	5.42	13.20	42.80	78.90	24.40	30.90	0.8	2.4	AA
5	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	K/17	4.71	11.00	36.50	77.50	23.30	30.00	0.8	2.2	AA
6	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	K/15	4.82	11.20	36.70	76.20	23.20	30.50	0.7	1.3	AA
7	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	E/10	5.04	11.50	37.50	74.40	22.80	30.60	1.0	2,7	AA
8	$\alpha^{-5nt}\alpha$ /αα	K/9	4.50	10.50	34.40	76.60	23.40	30.60	0.7	1.5	AA
9	$--^{20,5}$/αα	E/4	4.99	9.60	32.00	64.20	19.20	29.80	0.9	2.4	AA
10	αα/αα	E/41	4.85	13.70	43.10	88.70	28.10	31.70	1.0	1.7	AA
11	αα/αα	E/30	4.72	13.30	42.50	89.90	28.20	31.40	0.6	2.6	AA
12	αα/αα	E/21	4.85	12.50	42.20	86.90	25.80	29.70	0.9	1.7	AA
13	αα/αα	E/9	4.20	11.40	36.00	85.80	27.30	31.80	0.4	2.4	AA

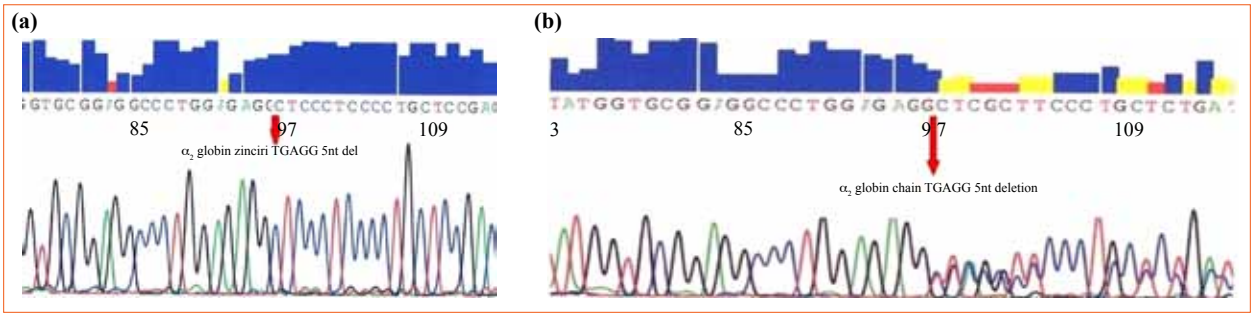
Bulgular

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 1992'den günümüze kadar olan süreçte 4000'den fazla aileye tanı konulmuştur. Doğum öncesi Tanı Merkezi'ne mutasyon analizi için başvuran bir olgunun DNA Dizi Analizi'nde Türkiye'de ilk kez gözlenen homozigot 5nt delesyonel mutasyonu saptanmıştır. Ailenin diğer bireylerinden alınan örnekler Gap-PCR ve DNA Dizi Analizi ile çalışılarak yedi olgunun α^{-5nt} mutasyonu taşıdığı, bir olgunun 20.5 kb'lık (--/αα) delesyonunu taşıdığı belirlenmiştir. Ailenin dört üyesinin ise hemoglobinopati açısından herhangi bir mutasyon taşımadığı gözlenmiştir. Olguların hematolojik ve mutasyon tipleri Tablo 1'de ve DNA Dizi Analizi sonucu Şekil 1'de gösterilmiştir.

Doğum öncesi tanı için başvuruda bulunan diğer bir ailenin fertlerinden toplam on bir olgunun kan örneği alınarak mutasyon tipleri çalışılmıştır. Selüloz asetat kağıdı elektroforezine göre üç olguda heterozigot olarak Hb S/D'nin bulunduğu bölgede bir bandın olduğu gözlenmiştir. HPLC analizinde Hb D ile aynı bölgede %23-26 oranında bir pike rastlanmıştır. Mikroarray yöntemi ile bu olguların Hb S, Hb D Los Angeles, Hb O Arap, Hb G Coushatta ve Hb D İran tipleri olmadıkları gösterilmiştir. RFLP yöntemi ile Hb D mutasyonu olmadığı belirlenince DNA Dizi Analizi ile bu mutasyonun Türkiye'de ilk kez gözlenen α globin geninde oluşan anormal hemoglobin olan Hb Stanleyville II mutasyonu [α_2 78 (EF 7) Asn→Lys (AAC→AAA)] olduğu gözlenmiştir. Gap-PCR yöntemine göre bu olgulardan birisinin Hb Stanleyville II ile birlikte 3.7 kb'lık delesyonu da taşıdığı, beş olgunun 3.7 kb'lık (-α/αα) delesyonu taşıdığı saptanmıştır (Şekil 2a ve 2b). Hb A_2 düzeyinin (%4.5) yüksek olan bir olgunun ARMS yöntemi ile IVS-1-110 (G→A) mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı bulunmuştur. Yapılan analizlerin sonuçlarına göre ailenin üç bireyinde hemoglobin anomaliliğine rastlanmamış olup ailenin hematolojik verileri ve mutasyon tipleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tartışma

Hemoglobinopatiler çoğunlukla α ve β globin zincirindeki bozukluklar nedeniyle meydana gelmektedir [1]. α-Talasemiler dünyada en yaygın olarak gözlenen gen hastalığıdır. Kılınç ve arkadaşları 1986 yılında yaptıkla-



Şekil 1. Alfa globin geninde meydana gelen 5nt delesyonel mutasyonunun DNA Dizi Analizi görüntüsü. **(a)** Homozigot 5nt delesyonel mutasyona sahip olgunun DNA Dizi Analizi görüntüsü (Olgu 1). **(b)** Heterozigot 5nt delesyonel mutasyona sahip olgunun DNA Dizi Analizi görüntüsü (Olgu 2).

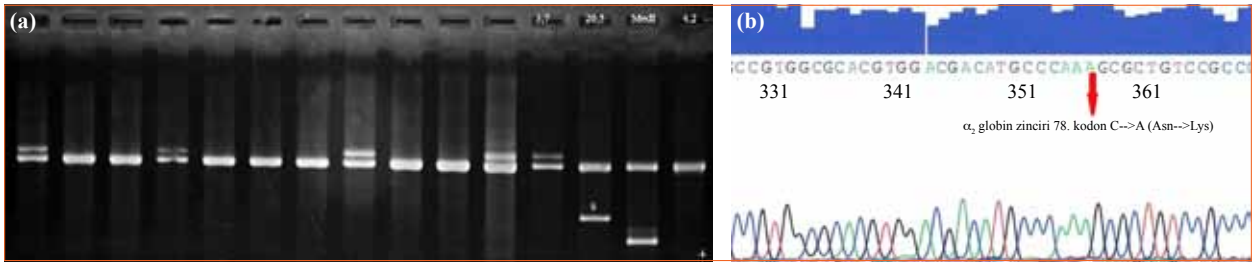
Tablo 2. Hb Stanleyville II mutasyonuna sahip olan bir ailenin hematolojik verileri ve mutasyon tipleri

No	α-Genotipi	Cinsiyet/Yaş	RBC (10^{12}/L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbF (%)	HbA_2 (%)	Hb Tipi
14	$-^{HbSt\ II}\alpha/-^{3,7}\alpha$	K/35	4.50	11.80	36.50	81.20	26.30	32.30	0.9	2.7	AS/D
15	$-^{HbSt\ II}\alpha/\alpha\alpha$	E/63	4.69	12.90	42.60	90.80	27.60	30.40	1.2	1.9	AS/D
16	$-^{HbSt\ II}\alpha/\alpha\alpha$	K/0	4.32	9.20	27.60	64.10	21.20	33.10	1.1	2.0	AS/D
17	$-^{3,7}\alpha/\alpha\alpha$	K/54	5.23	11.80	40.70	77.90	22.50	28.90	1.2	1.9	AA
18	$-^{3,7}\alpha/\alpha\alpha$	K/40	4.97	12.30	40.50	81.40	24.70	30.30	1.1	1.9	AA
19	$-^{3,7}\alpha/\alpha\alpha$	K/37	4.20	9.70	32.90	78.40	23.00	29.40	0.9	1.8	AA
20	$-^{3,7}\alpha/\alpha\alpha$	E/25	9.58	14.00	46.70	83.70	25.10	30.00	1.1	1.8	AA
21	$-^{3,7}\alpha/\alpha\alpha$	E/8	4.18	10.20	33.10	79.30	24.40	30.80	1.1	2.5	AA
22	αα/αα	E/32	6.77	13.60	45.00	66.40	20.10	30.30	2.5	4.5	A/IVS-1-110
23	αα/αα	K/47	5.17	15.10	48.30	93.30	29.10	31.30	1.0	1.9	AA
24	αα/αα	K/16	4.58	12.50	41.50	90.50	27.20	30.10	0.7	2.2	AA
25	αα/αα	E/16	5.50	13.90	46.40	84.30	25.40	30.10	0.8	2.3	AA

rı bir çalışmada Adana ve bölgesinde talasemi taşıyıcı sıklığını %3.3 olarak rapor etmişlerdir [18]. Türkiye'de en çok gözlenen α-talasemi mutasyonları 3.7 kb, 4.2 kb, 17.4 kb, 20.5 kb ve 26.5 kb delesyonel mutasyonlar ile Poli A kuyruğundaki (PA1 ve PA2) nokta mutasyonlarıdır [19].

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 1992 yılından beri Doğum öncesi tanı yapılmaktadır. Şimdiye kadar 4000'den fazla aileye tanı konulmuş olup 750'den fazla hasta çocuk doğumu engellenmiştir. Bu çalışmada mutasyon taraması yapılan ailedeki bir olgunun α-globin geninde 5nt delesyonel mutasyonu Türkiye'de ilk kez homozigot formunda taşıdığı DNA Dizi Analizi yöntemi ile gösterilmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1a). Ayrıca yedi olgunun bu mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 1b) Aynı olgular 5nt delesyonel mutasyonunu Gap-PCR yöntemine göre standardize edilerek tekrar çalışılmıştır. Nondelesyonel mutasyon grubuna giren 5 nt'lik delesyonel mutasyonlar RNA 'splicing' mekanizmasını etkilediklerinden bu talasemilerin heterozigotları α-talaseminin "trait" fenotipine, homozigotları ise α talasemilerin daha ciddi formlarına neden olurlar [20]. Heterozigot olguların hematolojik verilerinin normale yakın oldukları gözlenmiştir. Heterozigot olgularda frameshift (çerçeve kayması) meydana gelirken; homozigot olgularda frameshift meydana gelmez [1]. Gap-PCR analizine göre ailedeki bir olgunun α-talaseminin "trait" fenotipine neden olan 20.5 kb'lık delesyona sahip olduğu gözlenmiştir. Ailenin mutasyon taraması sonucuna göre dört olguda hemoglobin bozukluğu gözlenmemiştir (Tablo 1).

Kliniğinin ağır olmaması sebebiyle α globin zinciri mutasyonlarını belirlemek oldukça zor ve sınırlı sayıdadır. Altay ve Akar 2000'li yıllarda yaptıkları bir çalışmada α globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobin tiplerini rapor etmişlerdir [5-7]. Bu çalışmada α globin zincirinin 78. kodonunda Asparajinin→Lizin'e dönüşmesiyle oluşan ve Türkiye'de ilk kez gözlenen anormal hemoglobin tipi olan Hb Stanleyville II belirlenmiştir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda ailenin üç ferdinde Türkiye'de ilk kez gözlenen α globin geni anomalisi olan Hb Stanleyville II mutasyonu taşıdıkları DNA Dizi Analizi ile belirlenmiştir (Tablo 2 ve Şekil 2b). Olgulardan birinin Hb Stanleyville II ve 3.7 kb'lık delesyonel mutasyonunu birlikte taşıdığı, iki olgunun Hb Stanleyville II mutasyonunu taşıdığı ve ailenin beş olgusunun 3.7 kb'lık delesyonel mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı gösterilmiştir (Tablo 2 ve Şekil 2a). Ayrıca ailedeki bir olgunun ARMS mutasyon analizi yöntemi ile RNA "splicing" mekanizmasını etkileyen dünyada ve ülkemizde en yay-



Şekil 2. Hb Stanleyville II mutasyonu olan ailenin moleküler yöntemlerle mutasyon analizi. **(a)** Gap-PCR yöntemi ile 3.7kb delesyonu olan olgu örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(b)** Hb Stanleyville II içeren bir olgunun DNA Dizi Analizi görüntüsü (Olgu 14).

gın görülen β talasemi IVS-I-110 (G→A) mutasyonunu taşıdığı gözlenmiştir. β globin zincirinde yeni RNA 'splicing' bölgesini oluşturan bu mutasyon 110. Pozisyondaki G→A değişikliği β+ talasemi fenotipine neden olmaktadır [1]. Bu ailenin üç bireyinde herhangi bir hemoglobin mutasyonu gözlenmemiştir (Tablo 2).

İlk kez Dherte ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Sudanlı iki ailede belirlenen Hb Stanleyville II'nin hem plakları ya da hemoglobin polipeptid zincirleriyle etkileşime girmediği ve bu yüzden tek başına bir patolojisinin bulunmadığı rapor edilmiştir [21,22]. Burchall ve arkadaşları tarafından Hb S ile Hb Stanleyville II birlikteliği gösterilmiştir. Hb SS'li olgularla Hb S/ Hb Stanleyville II birlikteliği olan olgular kıyaslandığında Hb Stanleyville II'nin bulunduğu olguların eritrositlerinin fibrilleşmelerinin azaldığı bildirilmiştir. Hb Stanleyville II'nin hemoglobinlerin fibrilleşmelerine karşı inhibitör rol oynadıkları rapor edilmiştir [23]. Hb Stanleyville II mutasyonu ile 3.7 kb'lık delesyon birlikteliği sonucunda olgularda hafif mikrositer ve hipokromik anemi olduğu bildirilmiştir. [24]. Bu çalışmada Hb Stanleyville II taşıyan bireyler Adana doğumlu olup geçmişte Afrika'dan gelip, Adana bölgesine yerleşmiş olabileceği belki de bu bölgeden köken alanlarda da görülmesinin şaşırtıcı olmayacağı söylenebilir.

Kliniği ağır seyreden hemoglobinopatili hastaların tedavileri oldukça masraflıdır. Talasemi hastalarının yıllık tedavi masrafları 10-12000 $'ı bulabilmektedir. Yaşam süreleri boyunca bu maliyet gittikçe artmaktadır. Hemoglobinopati tanısının maliyeti yaklaşık 5 $'dır [25]. Hasta çocuk doğumunun engellenmesi ülke ekonomisine katkı sağlamaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez görülen anormal hemoglobin olan Hemoglobin Stanleyville II ve α talasemiye neden olan 5nt delesyonun ilk kez homozigot formunun moleküler düzeydeki tanımlamaları yapılmış ve böylece bu bulguların doğum öncesi tanıya katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Bilgi ve teşekkür

Bu makalede Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2009YL17 nolu proje ile desteklenmiş olan "Alfa Talasemi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi" adlı çalışmanın bulguları kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları 21., 22., 23., Ulusal Biyokimya Kongresi'nde ve 37. Ulusal Hematoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak, 7. Ulusal Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Çıkar çatışması

Yazarların çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

[1] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin 2009; pp. 138-381 2nd Ed, Cambridge University-Press, New York.

[2] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, et al. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood 1989; 73(5):1081-104.

[3] Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. Genet Med 2011; 13(2):83-8.

[4] Globin Gene Server. HbVar: A Database of human hemoglobin variants and thalassemias. http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter (Last accessed: August 2014).

[5] Altay Ç. Abnormal hemoglobins in Turkey. Turk J Haematol 2002; 19:63-74.

[6] Akar E, Akar N. A review of abnormal hemoglobin in Turkey. Turk J Haematol 2007; 24:143-5.

[7] Akar N. An updated review of abnormal hemoglobins in the Turkish population. Turk J Haematol 2014; 31(1):97-8.

[8] Dönbak L. İnsan hemoglobin varyantları. KSÜ Fen ve Müh Der 2005; 8:13-22.

[9] Vichinsky E. Complexity of alpha thalassemia: growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy. Ann N Y Acad Sci 2010; 1202:180-7.

[10] Kohn J. Separation of hemoglobin on cellulose acetate. J Clin Pathol 1969; 22(1):109-10.

[11] Huisman TH. High-performance liquid chromatography as a method to identify haemoglobin abnormalities. Acta Haematol 1987; 78(2-3):123-6.

[12] Huisman TH, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson SM, Jakway J. Microchromatography of hemoglobins. II. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A2. J Lab Clin Med 1975; 86(4):700-2.

[13] Singer K, Chernoff AA, Sınger L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood 1951; 6(5):413-28.

[14] Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, et al. Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. Clin Chem 2001; 47(6):1124-6.

[15] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. Blood 2000; 95(1):360-2.

[16] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 1989; 17(7):2503-16.

[17] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230(4732):1350-4.

[18] Kılınç Y, Kumi M, Gurgey A, Altay C. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. Doğa Tu Tıp Ecz Der 1986; 10:162-7.

[19] Çürük MA, Genc A, Hüseynova P, Zeren F, Aksoy K. Çukurova'da alfa talasemi genotipleri ve Hb H hastalığı. Türk Klin J Pediatr Sci 2007; 3(10):17-23.

[20] Smetanina NS, Oner C, Baysal E, Oner R, Bozkurt G, et al. The relative levels of alpha 2-, alpha 1-, and zeta-mRNA in HB H patients with different deletional and nondeletional alpha-thalassemia determinants. Biochim Biophys Acta 1996; 1316(3):176-82.

[21] Dherte P, Vanderpitte J, Ager JA, Lehmann H. Stanleyville I and II: two new variants of adult haemoglobin. Br Med J 1959; 2(5147):282-4.

[22] Van Ros G, Beale D, Lehmann H. Haemoglobin Stanleyville II (alpha asparagine replaced by lysine). Br Med J 1968; 4(5623):92-3.

[23] Burchall G, Maxwell E. Haemoglobin Stanleyville II modifies

sickle disease phenotype. Pathology 2010; 42(3):310-2.

[24] Costa FF, Sonati MF, Zago MA. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn----Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. Hum Genet 1991; 86(3):319-20.

[25] Güler E, Çelik M, Davutoğlu M, Ekerbiçer HÇ, Karabiber H. Kahramanmaraş İlinde Evlilik Öncesi Hemoglobinopati Taraması Sonuçlarının Değerlendirilmesi. TAF Prev Med Bull 2008; 7(3):243-4.