



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2022, 9(1): 18-22

Manisa Yöresinde Beta-Talasemi Mutasyon Dağılımı

Distribution of Beta-Thalassemia Mutation in Manisa Region

Şebnem Kader¹, Hüseyin Gülen², Fatma Taneli³

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonatoloji Birimi, Trabzon, Türkiye.

²Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Birimi, Manisa, Türkiye.

³Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biokimya Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye.

e-mail: sebnem_kader@yahoo.com, huseyingulen@hotmail.com, fatmataneli@gmail.com

Orcid: 0000-0001-7585-4228

Orcid: 0000-0002-5374-4957

Orcid: 0000-0002-5194-0460

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Şebnem Kader

Gönderim Tarihi / Received: 26.05.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 11.02.2022

DOI: 10.34087/cbusbed.943198

Öz

Giriş ve Amaç: Beta (β)-talasemi, Türkiye'deki en yaygın genetik bozukluklardan biridir. Bu çalışmanın amacı Manisa ili ve çevresindeki β -talasemi mutasyonlarının tipini ve dağılımını tespit etmek, Manisa'nın Türkiye β -talasemi mutasyon haritasındaki yerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışma; Etik Kurul onayı alındıktan sonra Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda prospektif olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya, β -talasemi taşıyıcılığı tanısıyla takip edilen 85 hasta alındı. β -talasemi taşıyıcılarında çalışmaya dahil edilme kriteri olarak HbA2 düzeyinin %3,5'in üzerinde olması dikkate alındı. Beta Globin Strip Assay yöntemi ile beta globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyon tarandı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 85 hastanın 15'inde, taranan 22 mutasyondan hiçbirinde pozitiflik saptanmadı. Kalan 70 hastanın 2 tanesinin birleşik heterozigot formunda (%2,8), 1 hastanın homozigot formunda (1.4), 67 hastanın da heterozigot formunda (%95,8) mutant alle taşıdığı tespit edildi. En yaygın görülen β -talasemi mutasyonu, Türkiye genelinde olduğu gibi IVS1-110 (%35,3) olarak bulundu. Bunu sırasıyla IVS2-1 (%14,1), codon 39 (%8,2), IVS2-745 (%7,1), IVS1-6 (%5,9), IVS1-1 (%3,5), codon 5 (%2,4), codon 8 (%3,5), codon 44 (%2,4), -87 (%1,2), codon 36/37 (%1,2) mutasyonları takip etti. -30, HbC, HbS, codon 6, codon 8/9, codon 22, codon 30, IVS1-2, IVS1-5, IVS1-116, IVS1-25, codon 44 mutasyonları hiçbir hastamızda tespit edilmedi.

Sonuç: Çalışmamızda beta globin strip assay testinin sensitivitesi %82,3 oranında bulundu. Beta-Talasemi mutasyonları açısından Türkiye'deki genel ortalamanın Manisa'da da değişmediği, IVS1-110 mutasyon tipinin Manisa'da da en sık mutasyon olduğu bulundu. Manisa ilinde talasemi taşıyıcılığının %4,5 gibi yüksek bir oranda bulunmasının yanı sıra en çok göç alan iller arasında yer alan ilimizde akraba evliliğinin fazla görülmesinden dolayı prenatal tanı merkezlerinin artırılması ve bir halk sağlığı sorunu olan bu konu üzerinde aktif olarak çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: β -talasemi, Manisa, Mutasyon.

Abstract

Objective: Beta (β) – thalassemia is one of the most common inherited genetic disorders in Turkey. The purpose of this study was to determine the type and distribution of β -thalassemia mutations in Manisa province and around of it and to determine the location of Manisa in the β -thalassemia mutations map of Turkey.

Materials and Methods: This study was carried out prospectively in Celal Bayar University Faculty of Medicine, Division of Pediatric Hematology, after the approval of the Ethics Committee. Eighty-five patients with a diagnosis

of β -thalassemia major and β -thalassemia carrier were included in the study. HbA2 level above 3.5% was taken into account as inclusion criteria in β -thalassemia carriers.

Results: 22 mutations frequently seen in the beta globin gene and specific to Mediterranean countries were screened with the Beta Globin Strip Assay method. No positivity of the 22 mutations screened were found in 15 of the 85 patients included in the study. It was determined that 2 of the remaining 70 patients carried the mutant allele in the combined heterozygous form (2.8%), 1 patient in the homozygous form (1.4), and 67 patients in the heterozygous form (95.8%). The most common β -thalassemia mutation overall was found IVS1-110 (35.3%), as in Turkey. This was followed by mutations of IVS2-1 (14.1%), codon 39 (8.2%), IVS2-745 (7.1%), IVS1-6 (5.9%), IVS1-1 (3.5%), codon 5 (2.4%), codon 8 (3.5%), codon 44 (2.4%), -87 (1.2%), codon 36/37 (1.2%), respectively. Mutations of -30, HbC, HbS, codon 6, codon 8/9, codon 22, codon 30, IVS1-2, IVS1-5, IVS1-116, IVS1-25, codon 44 were not detected in any of the patients.

Conclusion: In our study, the sensitivity of beta globin strip assay test was found to be 82.3%. Beta-thalassemia mutations weren't changed in terms of the overall average in Manisa in Turkey and IVS1-110 was found to be the most common type of mutation in Manisa.

We think that prenatal diagnosis centers actively working on this issue should be increased in number as β -thalassemia is a big public health problem due to the high rate of 4.5% of consanguineous marriage in Manisa province as it is one of the most immigrant attending provinces, as well as the high rate of thalassemia carriage.

Key words: β -thalassemia, Mutation, Manisa

1. Giriş

Beta (β) talasemi, 11. kromozomun kısa kolunda lokalize olan β -globin geninde genellikle nokta mutasyon sonucu ortaya gelişen, otozomal resesif olarak kalıtılan ve en sık görülen kan hastalığıdır [1]. Beta gen mutasyonuna göre hastalık β -talasemi majör, intermedia ve minör olarak üç kategoriye ayrılır [2].

Türkiye genelinde β -talasemi sıklığı %2,1, Güney Sahil Bölgelerinde %4,3, Manisa ilinde % 4,5 olarak bildirilmektedir [3, 4].

Ege Bölgesi, talasemi sendromları açısından oldukça geniş bir spektrum göstermektedir. Ege bölgesinde yer alan Manisa ilinde beta talasemi mutasyon dağılımı hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Gen mutasyonlarının dağılımının yöresel olarak farklılık göstermesi neticesiyle Manisa yöresinin de gen mutasyonlarının belirlenmesi ve en sık saptanan mutasyonların saptanması yöresel haritanın çıkarılması açısından faydalı olacaktır.

Bu çalışmanın amacı, Manisa ili ve çevresindeki mutasyonların tipini ve dağılımını tespit etmek ve Manisa'nın Türkiye β -talasemi mutasyon haritasındaki yerini belirlemektir.

2. Materyal ve Metod

Bu çalışma; Celal Bayar Üniversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı (Proje No:2008*051) alındıktan sonra, Mayıs 2008 ile Mayıs 2009 tarihleri arasında Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Poliklinik takibinde olan ve β -talasemi majör ve minör tanısı bulunan toplam 85 hastada prospektif olarak gerçekleştirildi. β -intermedia tanılı hastamız yoktu.

Çocuk Hematoloji Polikliniğine anemi etiyolojisi tetkik amacı ile yönlendirilip hemogram, periferik yayma, demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin çalışılıp talasemi ön tanısı ile Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile hemoglobin elektroforezi çalışılan hastalardan β -talasemi majör ve β -talasemi minor tanısı konulan hastalar çalışmaya

dahil edildi. β -talasemi minörlerde çalışmaya dahil edilme kriteri olarak HbA2 düzeyinin % 3,5'in üzerinde olması dikkate alındı [2]. Çalışmaya alınan tüm hastaların yasal vasilerinden yazılı onay alındı. Hastaların cinsiyet, doğum tarihi, doğum yeri not edildi; göç, ailede talasemi ve akrabalık öyküsü ve derecesi sorgulandı.

Beta-talasemi gen mutasyonlarını saptamak için hastalardan EDTA'lı tüpe 3 ml venöz kan örneği alındı. β -globulin mutasyon analizi revers hibridizasyon yöntemine dayalı Strip Assay (Vienna Lab; Vienna, Austria) yöntemiyle yapıldı. β -Globin Strip Assay yöntemi; biotinize PCR ürünlerinin reverse-hibridizasyon ile membran test striplerinin üzerine allel-spesifik oligonükleotidlerin sabitlenmesi temeline dayalı olarak yapılmaktadır.

Çalışmamızda "Strip Assay yöntemi" hazır reaktifler kullanılarak dört aşamada tamamlandı:

1- İlk aşamada genomik DNA, ekstraksiyon kiti (Spin Micro DNA Extraction Kit, Vienna Lab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak periferik EDTA'lı kandan ekstrakte edilerek -200C da saklandı. Toplanan örnekler haftada bir analiz edildi.

2- İlgili β -globulin gen sekanslarının amplifikasyonu için single multipleks PCR uygulandı.

3- Biotinize amplifikasyon ürünlerinin, test striplerindeki oligonükleotid problemlere hibridizasyonu yapıldı.

4- Spesifik bağlı mutant ya da wild-type alleleri, enzimatik renk reaksiyonu ile görünür hale getirilerek saptandı.

Her polimorfik pozisyonda 3 boyama ölçütü ile değerlendirildi:

1- Wild-type prob pozitif: normal genotip

2- Wild-type ve mutant prob pozitif ise heterozigot genotip (taşıyıcı birey)

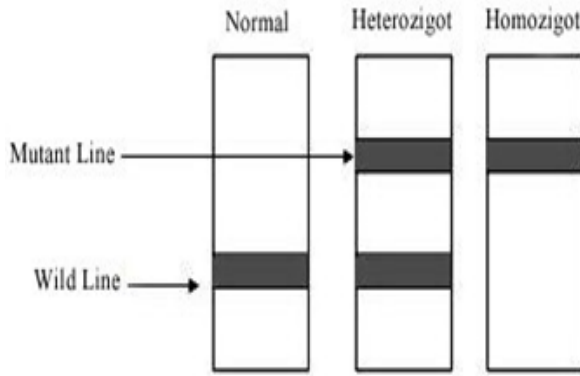
3- Mutant prob pozitif: homozigot mutant genotip (etkilenmiş birey) olarak değerlendirildi.

Beta globin strip assay yöntemi ile sonuçların yorumlanması Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Beta-globin strip assay yöntemi ile sonuçların yorumlanması

Wild	Mutant prob	Genotip
Pozitif	Negatif	Normal
Pozitif	Pozitif	Heterozigot
Negatif	Pozitif	Homozigot

Beta-globin strip assay yönteminde enzimatik reaksiyon ile görünür hale getirilen bantların strip üstünde yorumlanması Şekil 1’te gösterilmiştir.



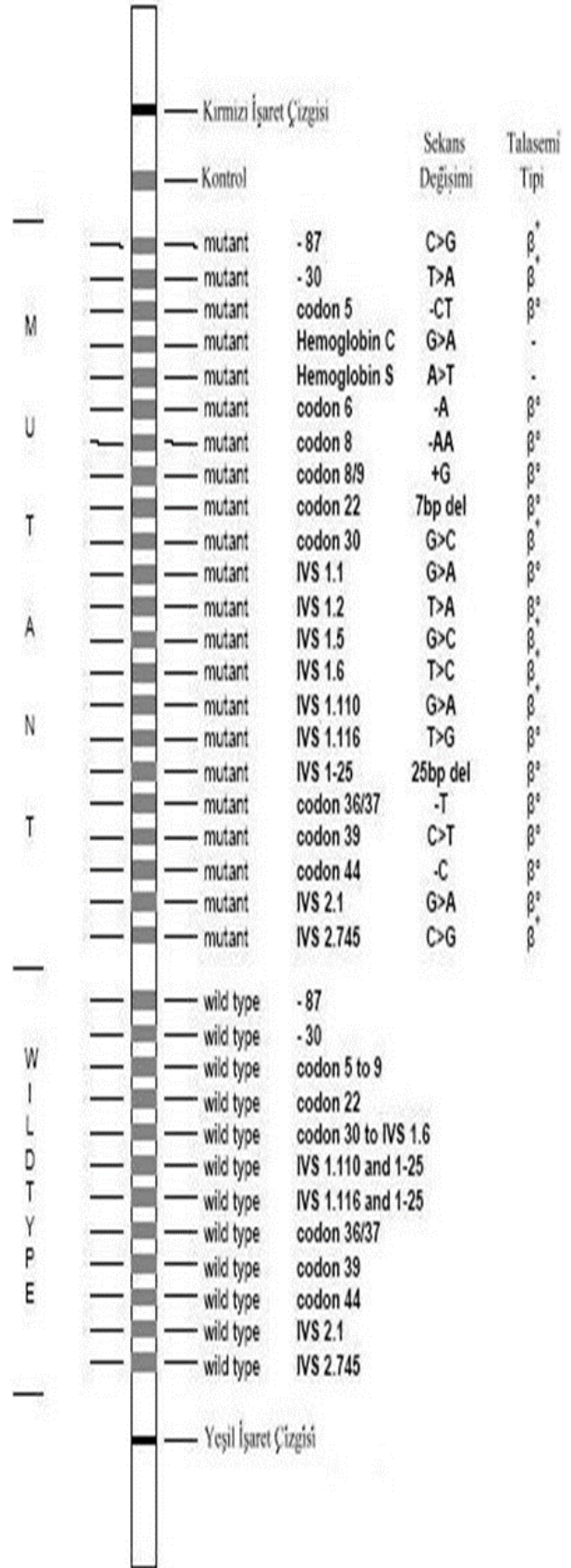
Şekil 1. Strip üzerindeki bantların yorumlanması

Beta globin strip testi beta globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi anormal hemoglobin (HbS ve HbC), 20 tanesi ise beta talasemi mutasyonudur. Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 tane normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın oldukları için bunlara tek bir normal oligonükleotid probu kullanılmıştır; dolayısıyla 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir (Şekil 2).

Beta Globin Strip Assay yöntemi ile beta globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyon tarandı. Taranan mutasyonların lokalizasyonları ve sekans değişiklikleri:

-87 [C>G], -30 [T-A], Codon 5 [-CT], Hemoglobin C, Hemoglobin S, Codon 6 [-A], Codon 8 [-AA], Codon 8/9 [+G], Codon 22 [7bp del], Codon 30 [G>C], IVS I.1 [G>A], IVS I.2[T>A], IVS I.5 [G>C], IVS I.6 (T>C), IVS I.110 [G>A], IVS I.116 [T>G], IVS I-25 [25bp del], Codon 36/37 [-T], Codon 39 [C>T], Codon 44[-C], IVS II-1 [G>A], IVS II .745 [C>G].

Çalışmaya alınan 85 hastanın verileri bilgisayara yüklendikten sonra, “Statistical Package for the Social Sciences 16.0 for Windows” (SPSS) paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Verilerin ortalama ve standart hata değerleri belirlendi. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, tanımlayıcı istatistiksel metodlar (Ortalama, Standart sapma) ve Student T test kullanıldı.



Şekil 2. Beta globin strip assay yönteminde kullanılan stripin görünümü

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmaya toplamda 85 hasta dahil edildi. Hastaların 3 tanesi β - talasemi major, 82 tanesi β talasemi minör tanısı ile izlenmekteydi. Hasta grubumuz 2-17 yaş arasındaydı. Ortalama yaş $8,2 \pm 4,2$ yıl olarak bulundu. Hastaların 40 tanesi kız (%47), 45 tanesi (%53) erkekti.

Köken olarak Manisa'lı olan 65 hasta (%76,5), Manisa dışı olan 20 hasta (%23,5) vardı. Akraba evliliği açısından sorgulandığında 17 hastanın (%20,1) ebeveynleri arasında akrabalık olduğu bulundu. Akrabalık derecesi açısından bakıldığında, akrabalık derecesi 1. derece olan 11 hasta (%12,9), 2. derece olan 2 hasta (%2,4), 3. derece olan 2 hasta (%2,4), 4. derece olan 2 hasta (%2,4) olduğu saptandı.

Çoğu anemi etiolojisi tetkik amacıyla hastanemize sevk edilmiş olan hastaların ailelerine talasemi taşıyıcılığı açısından kendi durumlarını bilip bilmedikleri sorulduğunda anne-babada talasemi taşıyıcılığı olduğu bilinen olgu sayısı 44 (%51,8) olduğu bulundu.

Manisa ili, Doğu bölgelerimizden en fazla göç alan iller arasında İstanbul, İzmir, Ankara gibi illerden sonra önde gelen iller arasında yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu 2009 verilerine göre, Ege Bölgesinin göç alma oranı %1.74 olarak hesaplanmıştır [5]. Bu durum kültürel zenginlik yanı sıra farklı mutasyonların da görülmesine yol açmaktadır. Yaptığımız çalışmada 11 farklı mutasyon tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen 85 hastanın 15 tanesinde HbA2 değerleri %3,5 üzerinde olduğu halde taranan 22 mutasyondan hiçbirinde pozitiflik saptanmadı. Kalan 70 hastanın 2 tanesinde birleşik heterozigot formunda (β^0/β^+) (%2,8), 1 hastanın homozigot formunda (β^0/β^0) (1,4), 67 hastanın da heterozigot formunda (β/β^+) (%95,8) mutant allele taşıdığı tespit edildi. İki hastada saptanan birleşik heterozigot formunda mutant alleller codon 8(-AA)/IVS II-745(C>G), IVS I-6(T>C)/Codon 39(C>T) formundaydı. 1 hastada saptanan homozigot formunda mutant allelin IVS I-110 / IVS I-110 formunda olduğu görüldü.

Çalışmamızda, Türkiye'de bugüne kadar yapılmış olan çalışmalara uygun olarak en sık mutasyon, IVS I-110 olarak saptandı. β -talasemi mutasyonları açısından Türkiye'deki genel ortalamasının Manisa'da da değişmediği ve ülke genelinde sıklıkla görülen IVS I-110 mutasyon tipinin Manisa'da da en sık mutasyon olduğu görüldü [6]. Tadmouri'nin yaptığı çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda IVS II-1(G>A) ikinci en sık mutasyon olarak saptandı [6]. IVS II-1(G>A) mutasyonunun Türkiye'de bölgelere göre dağılımı %2,6-8,5 arasında ve ortalama olarak %4,7 oranında gözükmekteydi. Bizim çalışmamızda bulduğumuz %14,1'lik bu oran, daha önceki çalışmalarda saptanan oranların üstünde olarak bulundu. Cd 39(C>T) %8,2'lik oran ile üçüncü en sık saptadığımız mutasyondur. Bu mutasyon, Türkiye'de bölgelere göre %0,9-7,6 arasında ve ortalama % 3,8 oranında gözükmekteydi [7]. Bu mutasyon Yunanistan, Bulgaristan, Romanya gibi Balkan ülkelerinde de sıklıkla rastlanan bir mutasyon tipiydi. Çalışmamızda Cd 39(C>T) mutasyonunu taşıyan

7 hastadan birinin Balkan göçmeni olduğunu, bir hastanın da Muğla'dan göç ile Manisa'ya geldiği öğrenildi. %5,9'luk oran bulduğumuz IVS I-6(T>C) mutasyonu ise Tadmouri'nin bölgemiz için belirttiği %12,6'lık orana göre daha düşük olarak bulundu [6]. Bu frekansları Tadmouri'nin Ege ve Akdeniz bölgelerinde toplam 198 hastada bulunduğu verilere göre oranladığımız düşünürsek 85 hasta üzerinde yaptığımız bu çalışmanın Manisa yöresinde talasemi mutasyonlarının dağılımını daha iyi gösterdiği düşünülebilir [6]. Tadmouri'nin sonuçlarına göre, bölgemizde IVS I-110 mutasyon oranının Türkiye genelindeki ve Ege/Akdeniz bölgesi için yaptığı çalışmadaki bulunduğu sonuçlara göre daha düşük olduğu görüldü [6].

Beta Globin Strip Assay testinin sensitivitesi %100 olarak belirtilmektedir [8]. Bu test ile DNA analizi yapmadan önce β -talasemi tanısının Hematoloji bölümlerinde kesin olarak konulması önemli bir husustur. Çalışmamızda Beta Globin Strip Assay testinin sensitivitesini %82,3 oranında bulduk.

Testteki mutasyonlardan hiçbirini taşımayan gözükken bir birey, nadir veya yeni bir mutasyon da taşıyor olabilir. Bizim çalışmamızda da taranan mutasyonlardan hiç birinde pozitiflik saptanmayan 15 hastanın bu açıdan değerlendirilmek üzere gen sekans analizi yapılması planlandı.

5. Sonuç

Manisa ilinde talasemi taşıyıcılığının %4,5 gibi yüksek bir oranda bulunmasının yanı sıra en çok göç alan iller arasında yer alan ilimizde akraba evliliğinin fazla görülmesinden dolayı prenatal tanı merkezlerinin artırılması ve bir halk sağlığı sorunu olan bu konu üzerinde aktif olarak çalışılması gerekmektedir.

Çalışmamızdaki verilerin tanı koyma ve tedavi planlamada klinisyene yardımcı olacağını ve Manisa ve çevresindeki gen haritasının çıkarılması ile ülkemizin talasemi mutasyon haritasının belirlenmesine katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

6. Teşekkür ve Bilgilendirme

Çalışmamız Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından projelendirilmiştir.

Referanslar

1. Weatherall, D.J., Clegg J.B., et al., The clinical and molecular heterogeneity of the thalassemia syndromes, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1980, 344, 83-100.
2. Origa Rn, β -Thalassemia, *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 2017, 19(6), 609-619.
3. Arcasoy A, Çavdar A, ve ark., Türkiye'de talassemi ve anormal hemoglobin insidansı, Ankara: Nuray Matbası, 1978, 19-26.
4. Canatan D, Dünyada ve Türkiye'de talassemi ve anormal hemoglobinler, Türk Hematoloji Derneği 5. Ulusal Talassemi Gençlik Kamptı, 2004, İzmir, Türkiye.
5. TÜİK, Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemine göre Düzey 1 bölgelerinin (12 bölge) aldığı göç, verdiği göç, net göç ve net göç hızı, Türkiye İstatistik Kurumu, 2009.
6. Tadmouri G.O, Tüzmen Ş, ve ark., Molecular and population genetic analyses of beta-thalassemia in Turkey, *American journal of hematology*, 1998, 57(3), 215-20.
7. Tadmouri G.O, Başak A.N, Beta-thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects, *Hemoglobin*, 2001, 25(2), 227-39.

8.Ugozzoli, L.A, Lowery J.D, et al., Evaluation of the BeTtha gene 1 kit for the qualitative detection of the eight most common Mediterranean beta-thalassemia mutations, *American journal of hematology*, 1998, 59(3), 214-22.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıf-GayriTicari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

