

**GENETİK DEĞİŞTİRİCİLERİN BETA TALASEMİ MAJOR VE INTERMEDIA KLİNİĞİNE ETKİLERİ****Effects of Genetic Modifiers on Clinics of Beta****Thalassemia Major and Intermedia**

Yöntem Yaman(0000-0002-9710-8653)<sup>1</sup>, Özgür Cartı(0000-0002-7604-6481)<sup>3</sup>, Gulcihan Özek(0000-0001-7111-4214)<sup>4</sup>, Huseyin Onay(0000-0002-0584-8866)<sup>5</sup>, Berna Atabay(0000-0003-2830-0964)<sup>2</sup>, Canan Vergin(0000-0002-4995-3852)<sup>1</sup>

**ÖZ**

**GİRİŞ ve AMAÇ:** Türk toplumunda  $\beta$  Talasemili hastalarda klinik iyileştirici; temel olarak  $\alpha/\alpha$  olmayan zincirler arasındaki dengesizliği düzelterek kliniği iyileştiren genetik faktörleri değerlendirmek.

**YÖNTEM ve GEREÇLER:** Çalışmaya Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi ve Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi çocuk hematoloji kliniğinde  $\beta$ -Talasemi Major (TM) ve  $\beta$ -Talasemi Intermedia (TI) tanıları ile takip edilen 84 hasta alındı. Hastaların klinik ve demografik özellikleri ( $\beta$  talasemi mutasyonları dahil) retrospektif olarak dosyalarından tarandı. Xmn1 polimorfizmi için tüm,  $\alpha$  talasemi mutasyonu için sonucu olmayan hastaların testleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapıldı.

**BULGULAR:** Yirmi altı TI hastasında Xmn1(+/+), Xmn1(+/-) polimorfizmleri,  $\alpha$  talasemi mutasyonları ve ılımlı  $\beta+$  aleller sırasıyla 10, 1, 5, 6 olarak saptandı. Talasemi intermedialı 26 hastadan 21'i (%80,8) bir veya daha fazla iyileştirici genetik faktöre sahipti. Elli sekiz TM hastasında ise Xmn1(+/+), Xmn1(+/-) polimorfizmleri,  $\alpha$  talasemi mutasyonları ve ılımlı  $\beta+$  aleller sırasıyla 1, 3, 4, 5 olarak saptandı. Talasemi Major olarak takip edilen 58 hastadan 11'i (%18,9) 'u 1 veya daha fazla genetik iyileştirici genetik faktöre sahipti. Çalışmada homozigot  $\beta 0$  mutasyonu olup TI kliniğiyle takip edilen bütün vakalarda hastaların Xmn1 (+/+) polimorfizmine sahip olduğu görüldü.

**TARTIŞMA ve SONUÇ:** Bu çalışma  $\beta 0$  mutasyonu bulunan talasemilerde en önemli genetik iyileştirici faktörün Xmn1 polimorfizmi olduğunu,  $\beta+$  mutasyon durumunda ise en önemli genetik iyileştirici faktörlerin  $\beta$  mutasyon tipi ve  $\alpha$  mutasyonu olduğunu göstermektedir.

1İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Çocuk Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji, İzmir, Türkiye

2Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji, İzmir, Türkiye

3Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı, Aydın, Türkiye

4Ege Üniversitesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

5Ege Üniversitesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Sorumlu yazar yazışma adresi:**  
Yöntem YAMAN. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Çocuk Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji, İzmir, Türkiye

E-mail:[yontemyaman@gmail.com](mailto:yontemyaman@gmail.com)

Geliş tarihi/Received: 12.05.2020

Kabul tarihi/Accepted: 24.06.2020

**Yayın hakları Güncel Pediatri'ye aittir.**

Güncel Pediatri 2020;18(2):237-51

**Anahtar Kelimeler:** Beta Talasemi Major, Beta Talasemi İntermedia, Xmn1 polimorfizmi,  $\alpha$ , talasemi mutasyonu,  $\beta 0$  talasemi mutasyonu

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Main purpose of this study is to evaluate the effects of some genetic modifiers; especially by correcting the imbalance between  $\alpha$ /non  $\alpha$  chains on clinical severity of Turkish  $\beta$  Thalassemia patients.

**MATERIALS and METHODS:** Eighty-four patients diagnosed as  $\beta$  Thalassemia Major (TM) or  $\beta$  Thalassemia Intermedia (TI) were recruited from pediatric hematology clinics of Dr. Behçet Uz Children's Hospital and Tepecik State Hospital. The clinical and demographic characteristics (including  $\beta$  Thalassemia mutations) of patients were retrospectively reviewed from patients' records. Genetic analysis of patients for Xmn1 Polymorphism and  $\alpha$  thalassemia mutations were done at Aegean University, Faculty of Medicine Department of Medical Genetics.

**RESULTS:** Xmn1 (+/+) genotype, Xmn1 (+/-) genotype,  $\alpha$  thalassemia gene deletion, mild  $\beta^+$  alleles were found in 10,1,5,6 of TI patients respectively. One or more positive genetic modifiers were found in 21 patients out of 26 TI (80,8%) patients. Xmn1 (+/+) genotype, Xmn1 (+/-) genotype,  $\alpha$  thalassemia gene deletion, mild  $\beta^+$  alleles were found in 1, 3, 4,5 of TM patients respectively. One or more positive genetic modifiers were found in 11 patients out of 58 TM (18,9%) patients. In the study, all TI patients having  $\beta^0$  mutations had Xmn1 (+/+) genotype.

**CONCLUSIONS:** This study showed that in cases of TI with  $\beta^+$  mutations most common genetic modifier factors are the type of mutation and presence of  $\alpha$  thalassemia, while in cases of  $\beta^0$  mutations the most common genetic modifier is the presence of Xmn1 (+/+) genotype.

**Key words:** Beta Thalassemia Major, Beta Thalassemia Intermedia, Xmn1 polymorphism,  $\alpha$ , thalassemia mutation,  $\beta^0$  thalassemia mutation

## GİRİŞ

Talasemiler en sık görülen tek gen ilişkili hastalıklardır (1). Ülkemizde saptanan  $\beta$ -talasemi taşıyıcı sıklığı % 2,1'dir ve düzenli transfüzyon gerektiren 4.500-5.000 civarında  $\beta$ -Talasemi Major (TM) hastası vardır (2,3).  $\beta$ -talasemi kliniği çok değişkendir. Transfüzyon bağımlılığı olmayan talasemi intermedialı (Tİ) hastalardan, ciddi transfüzyon bağımlı anemiye kadar değişen heterojen bir hastalık gidişi görülebilir. Hastalığın fenotipindeki değişikliklerin farklı globin genlerinin çeşitliliğine (birincil genetik değiştiricilere) bağlı olduğu düşünölmektedir (4). Mutasyonlar sonucu, mutant  $\beta$  talasemi alellerinin bir kısmında hiç  $\beta$  globin sentezi yapılamazken ( $\beta^0$ ), bir kısmında minimal eksiklik olabilmektedir ( $\beta^+$ , sessiz talasemi). Hastaların  $\beta$  globin zincirindeki mutasyonun cinsi fenotipi ortaya çıkaran genetik değiştiricilerin en önemlisidir.  $\alpha/\alpha$  olmayan zincirler arasındaki dengesizlik, inefektif eritropoezin artmasına yol açar ve  $\beta$  talasemi sendromlarının patolojisindeki temel belirleyicilerden sayılır (5). Bu yüzden  $\alpha$  talasemi taşıyıcılığı hastalığın fenotipine ılımlı etkide bulunur. Artmış hemoglobin F üretim kapasitesi de hastalığın fenotipini değiştiren önemli değiştiricilerdendir. Gama zincir yapımının devamı sonucunda yüksek HbF üretimi üç ana bölge tarafından denetlenmektedir (6). (Tablo 1). Bunlar 11p15.4 üzerinde HBG2: $\gamma$ -158C>T (Xmn 1), 6q23.3 üzerindeki HBS1L-MYB intergenik bölgesi ve 2p16.1 üzerindeki BCL11A'dır (7). Bu üç bölge, Kuzey Avrupalı insanların HbF artışının yaklaşık %50'sinden sorumlu bulunmuştur (8).

Talasemi hastalarında genetik paternin belirlenmesinin, genetik danışma verilmesinde ve bu hastaların takibinin düzgün şekilde yapılabilmesinde önemli olduğu düşünölmektedir. Bizim amacımız, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi ve Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesinde izlenen TM ve Tİ hastalarında  $\beta$  talasemi mutasyonlarının tipi, Xmn 1 polimorfizmi ve  $\alpha$  talasemi taşıyıcılığı durumlarını belirlemek suretiyle; moleküler patolojiye göre klinik seyrin, hastalığın tespit edilme aşamasında öngörölmesinde klinisyene yardımcı olabilmek, hastalığa önlem alma stratejilerine ve programlarına katkıda bulunabilmektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak ve Helsinki Deklarasyonu Kuralları'na uygun olarak çalışılmıştır.

Temmuz 2012 - Eylül 2012 tarihleri arasında, üç ay sürede yapılan çalışmaya Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ile Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi hematoloji kliniğinde TM ve Tİ tanısı ile izlenen, bir kısmı düzenli kan transfüzyonu ve şelasyon tedavisi alan yaşları 17 ay ile 27 yaş arasında değişen 84 hasta alındı. 18 yaşından büyük olan hastalar çalışmaya katılmayı kabul ettiklerini gösteren onamları kendileri imzalarken, 18 yaşından küçük hastaların onamları velilerinden alındı. Çalışmaya katılan hastaların 26'sı Tİ, 58'i ise TM olarak değerlendirildi. Hastaların çalışmaya katıldıkları merkezlerdeki tanıları da göz önüne alınıp 2 yaş altı transfüzyon başlanan ve düzenli transfüzyon alan gruplar TM grubunda değerlendirilmiştir. Tİ grubundaki hastalarda ilk transfüzyon sırasında yaşı en küçük olan 24 aylıkken transfüze edilmişti. Kırksekiz aya kadar 8 kez ve üzerinde transfüzyon alan Tİ hastası yoktu. Her iki hasta grubunun yaş, tanı hemogram, tanı yaş, ilk transfüzyon yaşı, hemoglobin elektroferez, beta talasemi mutasyon tipi, splenektomi durumu, yıllık eritrosit transfüzyon miktarı (ünite/yıl), transfüzyonel demir yükü (mg/kg/gün), kullanılan şelatör tipi, ferritin değerleri ile karaciğer, dalak büyüklükleri retrospektif olarak dosyalarından tarandı. Hastaların  $\beta$  talasemi için bakılan strip testleri ve gereken hastalarda bakılan gen sekansı sonuçları dosyalarından çıkarıldı. Düzenli transfüzyon yapılan hastaların kanları transfüzyon için geldiklerinde, düzenli transfüzyon yapılmayanların ise randevu tarihlerinde alındı. Testler çalışılma kadar -20 C'de saklandı. Alfa talasemi mutasyonu olmayan hastaların  $\alpha$  talasemi mutasyonu için strip testleri ve Xmn 1 polimorfizmi için genetik testler EUTF Tıbbi Genetik bölümünde yapıldı.

İstatistiksel değerlendirme SPSS 17.0 for Windows ve medcalc 12 istatistik programları kullanılarak yapıldı. Çalışma gruplarının sayısal verilerinin karşılaştırılmasında normal dağılış test edilerek t-test ve Mann-Whitney U test kullanıldı. Oranlar arasındaki ilişkinin karşılaştırılmasında ki kare ve Fisher's Exact testi kullanıldı. Ki Kare ve Fisher's Exact testinde anlamlılık saptanan parametreler çok değişkenli analize dahil edilerek anlamlılık ve odds oranları saptandı. Hastalara taşıdıkları alellere göre skor verilerek yapılan değerlendirmeye ait grafikler çizildi. Bu grafiklerde skor 1'de hastaların taşıdıkları her ılımlı  $\beta^+$  mutasyonu için 1 puan verildi.  $\beta^+$  olmasına rağmen ılımlı mutasyon kabul edilmeyen IVS I-110 (G>A) ve IVS II

745 (C>G)'e puan verilmedi.  $\alpha$  talasemi gen mutasyonu için her alel için 1 puan, Xmn 1 (-/+ ) için 1 puan (+/+) için 2 puan verildi. Skor 2'de ılımlı FSC-8 (-AA), FSC-6 (-A), IVSII-1 (G>A)  $\beta^0$  mutasyonlarına ayrıca puan verildi. Hastalarda ılımlı ve sessiz  $\beta$  mutasyonları tablo 1 'de gösterilmiştir (6). Ayrıca oluşturulan skorların Tİ belirleyiciliğini saptamak için "Receiver Operating Characteristics" (ROC) eğrisi ve bununla ilişkili "area under the curve" (AUC) değeri saptandı. Ayrıca skorların cut off değerlerindeki (en yüksek youden index) duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplandı. Ayrıca her iki skor AUC değerleri arasındaki ilişki DeLong ve arkadaşları metodu ile araştırıldı. P<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

**Tablo 1.** İlimli ve sessiz  $\beta$  talasemi mutasyonları (6)

Sessiz $\beta$ Talasemi Mutasyonları	İlimli $\beta^0$ Mutasyonları	İlimli $\beta^+$ Mutasyonlar
Transkripsiyonel Mutasyonlar	Çerçeve Kayması	Transkripsiyonel Mutasyonlar
CACCC kutusu	Cd 6 (-A)	CACCC kutusu
-101(C>T)	FSC-8 (-AA)	-90 (C>T)
-92( C>T)	Splicing Noktası	-88 (C>T)
5' UTR	IVSII-1 (G>A)	-88 (C>G)
+1' (A>C)		-86 (C>T)
Alternatif splicing		-86 (C>G)
cd27 (G>T) (Hb Knossos)		TATA kutusu
3' UTR		-31 (A>G)
+6 C>G		-29 (A>G)
Poli(A) Bölgesi		-30 (T>A)/
AATAAG		5' UTR
IVSII-844 (T>C)		+22(G>A)
		+33 (C>G)
		Alternatif splicing noktası
		Cd 19 (A>C)
		Cd 24 (T>A)
		Cd 27 (G>T)
		Konsensus splicing noktası
		IVSI-6 (T>C)
		Poli (A) Bölgesi
		AACAAA /
		AATGAA

## SONUÇLAR

Çalışmaya alınan seksen dört hastanın 43'ü (%51,2) kız, 41'i (%48,8) erkekti. Hastaların en küçüğü 17 aylık, en büyüğü 27 yaşında olup, yaş ortalaması  $139,5 \pm 54$  ay olarak bulundu. TM ve TI olarak çalışmaya alınan grupların çalışmaya alındığı yaşlar açısından farklılık saptanmadı ( $p=0,082$ ). TM ve Tİ olarak takip edilen hastaların ortalama tanı hemoglobin değerleri sırasıyla  $5,7 \pm 1,1$  g/dl ve  $7,5 \pm 1,5$  g/dl bulundu, karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p<0,05$ ). TM ve Tİ olan hastaların ortanca ferritin değerleri sırasıyla 1194,5 ng/dl (minimum 320 - maksimum 4678) ve 450 ng/dl (minimum 119 - maksimum 3250) olarak saptandı, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,02$ ). TM ve Tİ hastalarında ortanca transfüzyonel demir yükü sırasıyla 0,35 (minimum 0,23 - maksimum 0,65) ve 0,11 mg/kg/gün (minimum 0 - maksimum 0,44) olarak saptandı, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p<0,05$ ). TM ve Tİ için ortanca tanı yaşları sırasıyla 10 ay (minimum 2 - maksimum 42 ay) ve 55 aydı (minimum 24 - maksimum 112 ay). TM ve Tİ için ortanca ilk transfüzyon yaşları sırasıyla 10 ay (minimum 2-maksimum 42 ay) ve 57 aydı (minimum 24 - maksimum 112 ay). Ortanca tanı yaşları ve ilk transfüzyon yaşları her iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ). Tanı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) hastaların bir kısmında çeşitli sebeplerle ilk transfüzyon öncesinde alınmadığı vakalar dışlandıktan sonra kalan 60 hastada değerlendirildi. TM ve Tİ olan hastaların ortalama HbF değerleri sırasıyla  $67,9 \pm 18,5$  ve  $80,2 \pm 14,1$  olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,03$ ). TM hastalarından hepsi düzenli transfüzyon grubundayken, Tİ grubunda 8 hasta hayatı boyunca 2 veya daha az transfüze olmuştu, 8 hasta yılda 3 defadan daha az transfüze ediliyordu, 10 hastaya ise çeşitli nedenlerle düzenli kan tranfüzyonu uygulanıyordu. TM grubunda 7, TI grubunda 10 hastaya splenektomi uygulanmıştı. Şelatör kullanan hasta TM grubunda 57 (%98,3), TI grubunda 14 (%53,8) kişiydi.

Bu verilerin bizim genetik çalışmamızın sonuçları üzerine direk etkisi olmasa da talaseminin iki ayrı grubunun verilerini kıyaslama amacıyla belirtilmiştir.

TM'lu hastalarımızda en sık gördüğümüz mutasyon % 39,7 ile IVSI-110(G>A) homozigot mutasyonuydu. Tİ hastalarımızda ise en sık görülen homozigot mutasyon %19,2 ile FSC-8 (-AA) homozigot mutasyonu idi. Hastalarımızda görülen talasemi mutasyonları tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Hastalarda görülen  $\beta$ -talasemi mutasyonları.

$\beta$ talasemi mutasyonu	TM	TI	TM+TI
IVSI-110(G>A) homozigot	23(%39,7)	3 (%11,5)	26 (%30,9)
IVSII-745(C>G) homozigot	4 (%6,9)	0	4 (%3,4)
FSC-8 (-AA) homozigot	3 (%5,2)	5 (%19,2)	8 (%6,7)
IVSI-110(G>A)+IVSI-6(T>C)	3 (%5,2)	3 (%11,5)	6 (%5,0)
Cd 39 (C>T) homozigot	2 (%3,4)	1 (%3,8)	3 (%2,5)
IVSII-1 (G>A) homozigot	2 (%3,4)	3 (%11,5)	5 (%4,2)
IVSI-5(G>C) homozigot	2 (%3,4)	0	2 (%1,7)
IVSI 110 (G>A) / FSC-8 (-AA)	2 (%3,4)	1 (%3,8)	3 (%2,5)
IVSI-110(G>A) / IVSI-1(G>A)	2 (%3,4)	0	2 (%1,7)
IVSI-110(G>A) / Codon 39(C>T)	2 (%3,4)	0	2 (%1,7)
Cd 15 (G>A) homozigot	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-6(T>C) homozigot	1 (%1,7)	2 (%7,7)	3 (%2,5)
FSC-8 (-AA)/ FSC-5 (-(-/+))	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-110(G>A) / FSC-74/75(-C)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-110(G>A)/-88 (C>A)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-110(G>A) / IVSII-745(C>G)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-110(G>A) / IVSII-1(G>A)	1 (%1,7)	1 (%3,8)	2 (%1,7)
IVSI-5(G>C) / IVSI-1 (G>A)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
IVSI-1(G>A) / IVSII-1 (G>A)	1 (%1,7)	1 (%3,8)	2 (%1,7)
IVSII-1(G>A) /-30 (T>A)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
$\beta$ nt-28 (A > G) homozigot	1 (%1,7)	1 (%3,8)	2 (%1,7)
Codon 39 (C>T) / FSC-6 (-A)	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
FSC-44 (-C) homozigot	1 (%1,7)	0	1 (%0,8)
FSC-8 (-AA) / -30 (T-A)	0	1 (%3,8)	1 (%0,8)
IVSII-745(C>G) / Cd 22 (G>A)	0	1 (%3,8)	1 (%0,8)
FSC-8/9 (+G) / bilinmeyen	0	1 (%3,8)	1 (%0,8)
FSC-44 (-C) / -30 (T>A)	0	1 (%3,8)	1 (%0,8)
IVSI-110(G>A) / FSC-44 (-C)	0	1 (%3,8)	1 (%0,8)
<b>Toplam</b>	<b>58</b>	<b>26</b>	<b>84</b>

Hastalarda taranan 22 değişik  $\alpha$  talasemi mutasyonundan sadece  $\alpha$  (3.7) tek gen delesyonu saptanmıştır. Hastaların  $\alpha$ -talasemi mutasyonları ve birliktelik gösterdikleri fenotip tablo 3’de görülmektedir.

Tablo 3. Hastalarda saptanan  $\alpha$  talasemi mutasyonları.

Mutasyon tipi	TM		TI		P
	N	%	N	%	
Homozigot $\alpha$ (3.7) tek gen delesyon	2	3,4			
Heterozigot $\alpha$ (3.7) tek gen delesyon	2	3,4	5	19,2	
Toplam	4		5		0,037

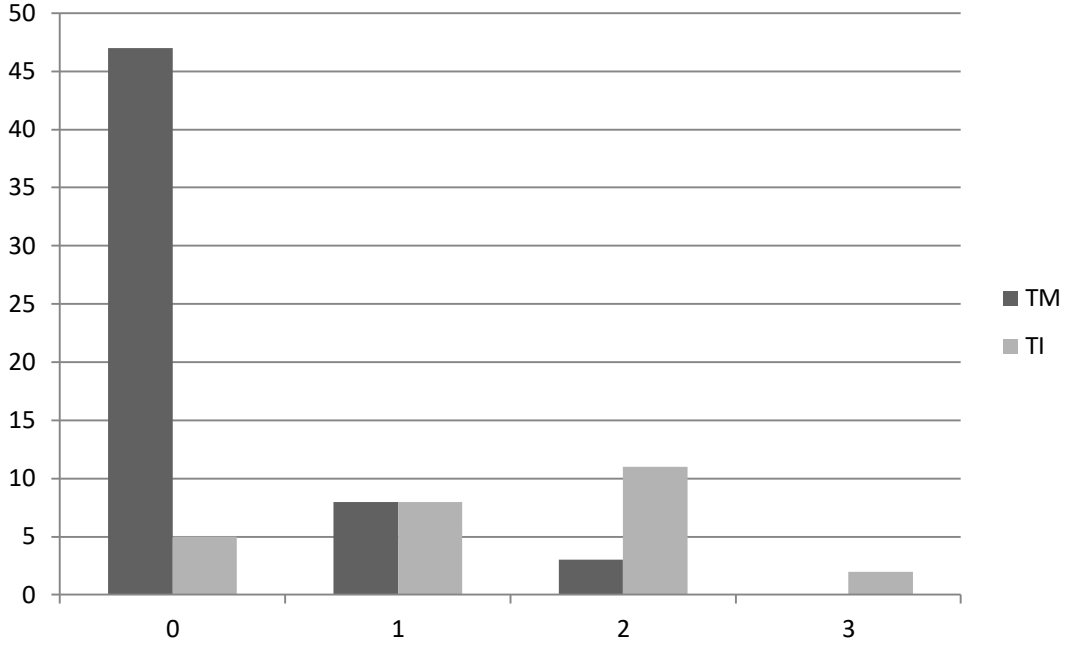
Hastaların Xmn 1 polimorfizmleri ve birliktelik gösterdikleri fenotip tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Hastalarda saptanan Xmn 1 polimorfizmleri.

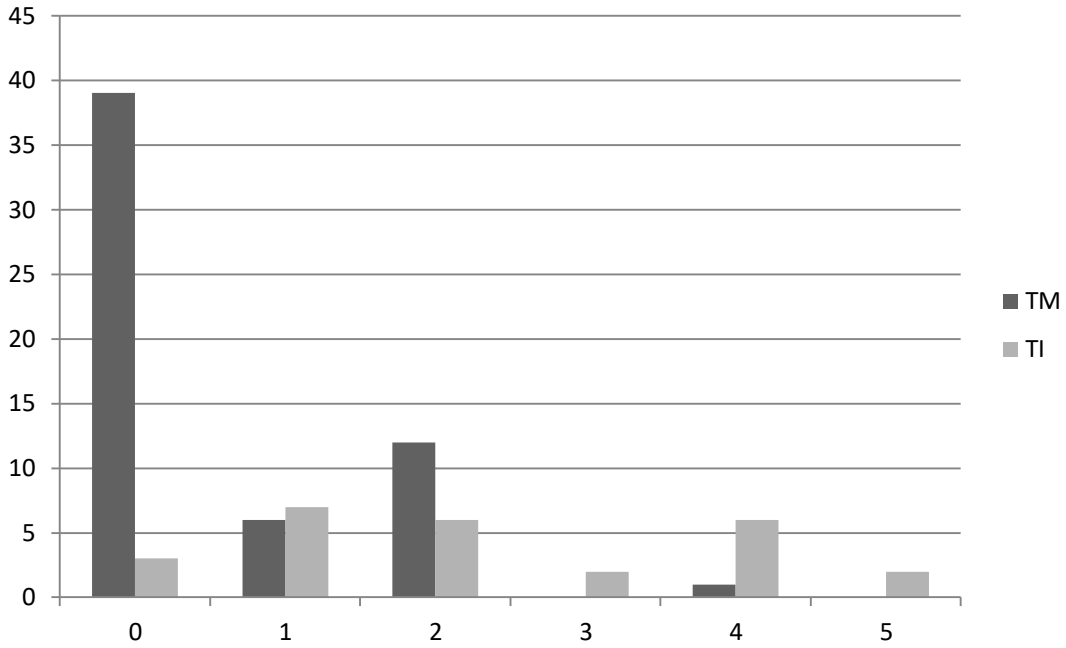
Polimorfizm	TM		TI		TM+TI	
	N	%	N	%	N	%
Xmn 1 (-/-)	54	93	15	58	69	82,2
Xmn 1 (-/+)	3	5,3	1	3,8	4	4,7
Xmn 1 (+/+)	1	1,7	10	38,2	11	13,1

Hastalara taşıdıkları alellere göre skor verilerek yapılan değerlendirmeye ait grafikler Şekil 1'de ve Şekil 2'de gösterilmektedir. Ayrıca hastalarda Tİ'yı öngörebilebilmek açısından her 2 puanlamaya göre skorlamalar ROC (Receiver operating characteristics) yöntemi ile değerlendirildi. Her iki skorun Tİ tahmin ediciliği açısından yapılan ROC değerlendirmesi ile AUC (area under curve) değerleri skor 1, skor 2 için sırasıyla 0,838 ve 0,818 olarak anlamlı saptanmıştır. Her iki ROC eğrisinin DeLong yöntemi ile karşılaştırılması sonucunda iki eğri arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0,58). Her iki skor için youden indekse göre saptanan cut off değeri 1 olup bu değer için sensitivite ve spesifite değerleri Şekil 3'te gösterilmiştir.

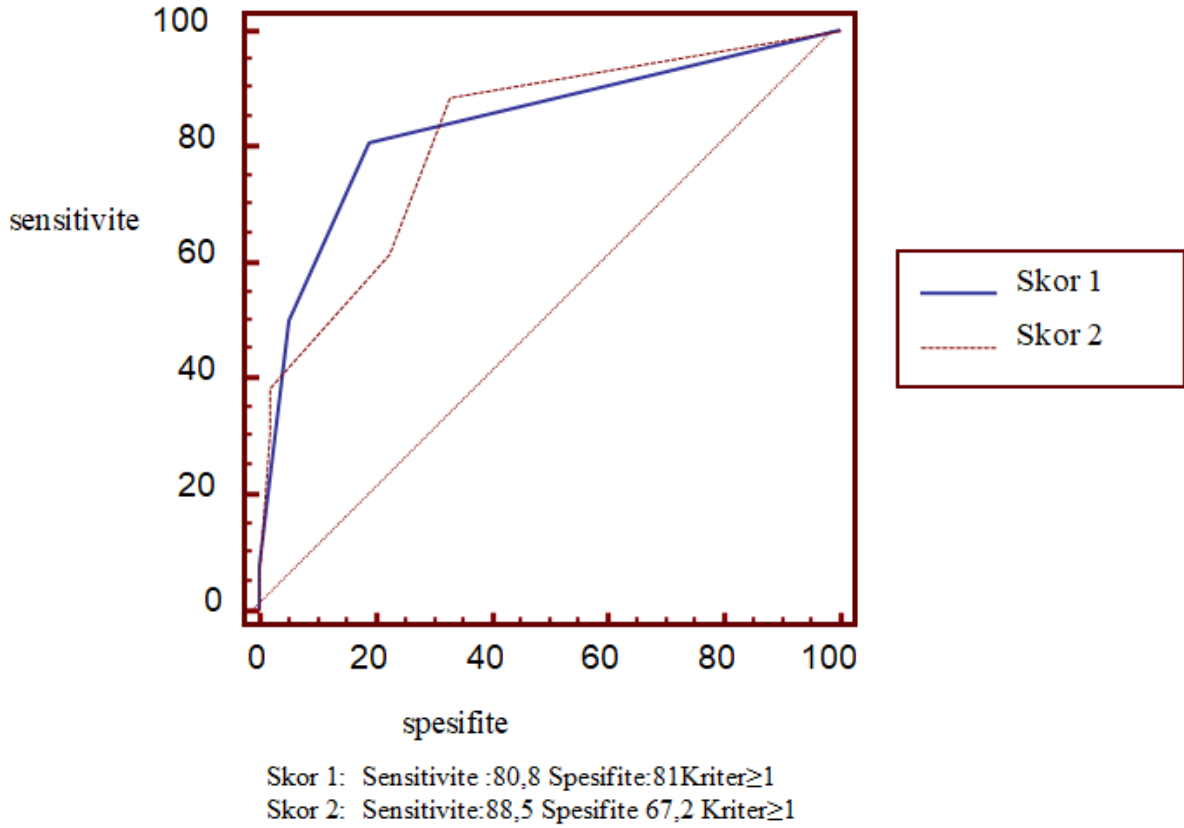




**Şekil 1.** TM ve Tİ hastalarında etkilenen düzeltici allel sayısına göre dağılım (skor 1).



**Şekil 2.** Talasemi major ve talasemi intermedia hastalarında etkilenen düzeltici allel sayısına göre dağılım (ılımlı  $\beta^{\circ}$ 'lar dahil)



**Şekil 3.** Talasemi intermediayı öngörmeye skorlamaların ROC yöntemi ile karşılaştırılması.

## TARTIŞMA

Talasemi major hastalarında en sık görülen ilk üç mutasyon IVSI-110 (G>A), FSC-8 (-AA), IVSII-745 (C>G), Tİ hastalarında IVSI-110 (G>A), FSC-8 (-AA), IVSII-1 (G>A), tüm grupta ise IVSI-110 (G>A), FSC-8 (-AA), IVSII-1 (G>A) olarak saptandı. Talasemi major hastalarında en sık görülen üç mutasyon Altay ve ark'nın yaptığı çalışmada IVSI-110 (G>A), IVSI-1(G>A), IVSII-745 (C>G); Nişli ve ark'nın yaptığı çalışmada IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C) ve IVSI-1; Başak'ın çalışmasında ise IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C), FSC-8 (-AA) olarak saptanmıştı (9,10,11). Talasemi intermedia hastalarında ise Altay'ın çalışmasında en sık görülen 3 mutasyon IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), -30 (T>A) olarak saptanmıştı. Bu üç mutasyondan sadece IVSII-1 (G>A) mutasyonu bizim çalışmamızda sık görülen mutasyonlardan biri olarak saptandı. Sonuçta asırlardan bu yana birçok medeniyete ev sahipliği yapan ülkemizde genetik çeşitliliğe bağlı olarak en çok görülen 6 mutasyon diğer pek çok

ülkede olduğu gibi mutasyonların %90-95'ini kapsamamakta bölgesel olarak mutasyonlarda değişiklikler görülebilmektedir, ayrıca küçük hasta serilerinde sonuçlar grubun boyutundan dolayı farklılık gösterebilmektedir.

İran, İtalya ve Hindistan'dan yapılan bir çok çalışmada, Xmn 1 polimorfizmi ciddi  $\beta$  talasemilerde kliniği iyileştiren ana faktör olarak gösterilmiştir (5,64,70,71,72,78). Bu çalışmalarda Xmn 1 polimorfizmi FSC-44 (-C), IVS I-5 (G>C), IVS II-1 (G>A), -87 (C>G), FSC-8 (-AA) IVS I-130, IVSII-745, codon 39 (C>T), IVSI-6 (T>C), IVSI-1 (G>A), IVSI-110 (G>A) mutasyonlarıyla ilişkili saptanmıştır (4,12,13,14,15). Bahadır ve arkadaşlarının Denizli'de yaptığı çalışmada ise IVSII-1 (G>A), FSC 44 (-C), -87 (C>G), IVSI-5 (G>C), IVS I-130, IVSII-745, FSC-8 (-AA), codon 39 (C>T), IVSI-6 (T>C), IVSI-1 (G>A), IVSI-110 (G>A) mutasyonu taşıyan kromozomlarda saptadıkları Xmn 1 (+)'liği sırasıyla %89, %75, %66, %50, %50, %42, %40, %30, %17, %14, %13 bulunmuştur (16). Daha önce yapılan bir çok çalışmada anemik olmayan toplumlarda sıklığı % 13 - % 35 arasında saptanan bu polimorfizm, ülkemizde şu ana kadar önemli hasta sayısı yapılan bir çalışmada sağlıklı grupta % 21,5, talasemi taşıyıcılarında % 17,6, TM hastalarında % 7,4 oranında saptanmıştır (16). Thadmouri ve ark. ülkemizde  $\beta$  TM'lu hastalar üzerinde kısıtlı hasta sayısı yapılan bir başka çalışmada Xmn 1 alelinin sıklığını %16,1 olarak saptamışlardır (17). Bizim çalışmamızda da tüm hasta grubunda Xmn 1 alelinin görülme sıklığı % 15,4, TM hastalarında %3,12, Tİ hastalarında ise % 40,4 olarak saptandı. Daha önce yapılan çalışmaların büyük kısmında çalışmamızda olduğu gibi, Xmn 1 polimorfizmi Tİ hastalarında TM hastalarından anlamlı olarak farklı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda Xmn 1 polimorfizmini homozigot taşıyan birey sayısı, Tİ'lı grubun % 38,5'ünü oluşturmakta olup, bu rakam % 3-26 arasında sonuçları olan pek çok çalışmaya göre daha fazla saptanmıştır, buna karşın İran'dan yapılan çalışmalarda bu oran % 60'ları bulmaktadır (18,19). Bu farklılık Xmn 1 (+/+) olan bireylerin FSC-8 (-AA) ve IVSII-1 (G>C) olan hastalarda daha sık saptanması ve bizim hasta grubumuzda bu iki grubun yoğun olması; İran'daki hastalarda ise IVSII-1 (G>C) mutasyonunun yoğun olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Talasemi intermedia kliniği ile takip edilen hastalarda  $\beta$  globin genotipiyle Xmn 1 polimorfizmleri birlikte değerlendirildiğinde, Xmn 1 (+/+) ve (-/+) olan hastalar,  $\beta$ +/ $\beta$ + genotipindeki hastaların % 0'ını,  $\beta$ +/ $\beta$ 0 genotipindeki hastaların % 60'ını,  $\beta$ 0/ $\beta$ 0 genotipindeki hastaların % 66,6'sını oluştururlar. Benzer sonuçlar diğer yazarlar tarafından da gösterilmiştir (20,21). Verma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Xmn 1 (+/+) ve (-/+) olan hastalar,  $\beta$ +/ $\beta$ + genotipindeki hastaların % 8,8'ini,  $\beta$ +/ $\beta$ 0 genotipindeki hastaların % 42,9'unu,  $\beta$ 0/ $\beta$ 0

genotipindeki hastaların % 87,3'ünü oluşturmaktaydı (21). Görüldüğü gibi  $\beta^0$  talasemi mutasyonu olan Tİ'li hastalarda Xmn 1 (+/+) ve (-/+) daha fazla görülmektedir. Bu veriler Xmn1 (+/+), (-/+) polimorfizminin, özellikle  $\beta^0$  mutasyona sahip hastalarda fenotipi iyileştirici rolü olduğunu göstermektedir.

Talasemi intermedia grubunda  $\alpha$  talasemi mutasyonu saptanan bireyler çıkarılıp normal  $\alpha$  globin geni olan hastalar dikkate alındığında, Xmn 1 (+/+) ve (-/+) olan hastalar  $\beta^+/\beta^+$  genotipindeki hastaların % 0'ını,  $\beta^+/\beta^0$  genotipindeki hastaların % 50'sini,  $\beta^0/\beta^0$  genotipindeki hastaların % 60'ını oluşturmaktaydı. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu olup, sonuçların  $\beta^0$  mutasyonu olan hastalarda G $\gamma$  promoter bölgesinin polimorfizminin kliniği iyileştirici etkisi olduğunu göstermektedir (20,21).

Ülkemizde yapılan iki ayrı çalışmada,  $\alpha$  talasemi taşıyıcılığı oranı %2,9 ve %7,5 olarak son derece farklı bulunmuştur (22,23). Çalışmamıza katılan hastaların 9'unda (%10,7)'sinde  $\alpha$  talasemi mutasyonu saptandı. Çalışmamızda Türkiye'de görülen mutasyonlardan 3.7 single gen delesyonu 7 hastada heterozigot, 2 hastada ise homozigot olarak bulundu. Talasemi intermedia kliniği ile takip edilen hastalarda  $\beta$  globin genotipiyle  $\alpha$  talasemi mutasyonu birlikte değerlendirildiğinde, heterozigot 3.7 single gen delesyonu olan hastalar  $\beta^+/\beta^+$  genotipindeki hastaların % 33'ünü,  $\beta^+/\beta^0$  genotipindeki hastaların % 0'ını,  $\beta^0/\beta^0$  genotipindeki hastaların % 16,7' sini oluşturdular. Bu sonuçlardaki dağılım diğer çalışmalardakilerine benzer bulundu (18, 21, 24). Çalışmamızda  $\alpha$  gen mutasyonu saptanan hastaların oranı, Tİ grubunda %19,2 (5/26) iken TM hastalarında % 6,9 (4/58) saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı saptanan bu farklılık diğer çalışmalarda da mevcuttu (21,25).

Çalışmamızda Tİ grubunda en sık görülen 4 alelin talasemi fenotipine olan etkileri tek tek değerlendirildi. IVSI-6 (T>C)  $\beta$  talasemi alellerinin ılımlı aleller olduğu, homozigot ve birleşik heterozigotluk durumlarında bilinen diğer düzeltici faktörler olmadan da Tİ kliniğine yol açabileceği değişik çalışmalarda gösterilmiştir (6,12). Bizim çalışmamızda da IVSI-6 (T>C) homozigot saptanan hasta sayısı 3'tü. Bunun dışında da 6 hastada IVSI-110 (G>A)/IVSI-6 (T>C) birleşik heterozigotluk saptandı. IVSI-6 A homozigot saptanan 3 hastadan 2'si Tİ, biri TM kliniğiyle takipliydi. Birleşik heterozigot saptanan 3 hasta TM, 3 hasta Tİ olarak takipteydi IVSI-110 (G>A) homozigot olması durumunda Xmn 1 polimorfizminin tek iyileştirici faktör olduğunu öngören çalışmalara karşın, bizim Tİ hasta grubumuzda IVSI-110 (G>A) homozigot olup Xmn 1 (+/+) veya Xmn 1 (-/+) hasta yoktu (6, 27). Buna karşın Tİ kliniği ile takip edilen 3 hastamızın 2'sinde heterozigot 3,7 single gen delesyonu tespit edildi. IVSI-110 (G>A) homozigot olan ve TM grubunda takip edilen diğer 23 hastamızda ise, düzeltici genetik

değişiricilerden homozigot 3.7 tek gen delesyonu 2 hastada, heterozigot 3.7 tek gen delesyonu 1 hastada saptandı. Bu durumun benzeri Ratip ve arkadaşlarının çalışmasında da görülmüştür (25). Yazarlar bu durumu 3.7 $\alpha$  gen delesyonunun etkisinin tutarlı olmamasına bağlamışlarsa da, Xmn 1 polimorfizmi olmamasına rağmen değişik fenotipler oluşmasının sebebi bilinmemektedir. FSC-8 (-AA) bizim çalışma grubumuzda 5 hastada homozigot olarak, 1 hastada -30 (T>A) bir hastada IVSI-110 (G>A) ile birlikte görüldü. IVSI-110 (G>A) ile birlikte görüldüğü hastada ve homozigot görüldüğü bütün hastalarda aynı zamanda Xmn 1 (+/+) saptandı. ılımlı  $\beta^+$  mutasyon olan -30 (T>A) ile birliktelik gösterdiği vakada Xmn 1 (-/-) idi. Türkiye’de daha önce Altay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da Tİ’de en sık görülen mutasyon homozigot FSC-8 (-AA) saptanmıştı. Bizim çalışmamızda Xmn 1(+) saptanan 26 kromozomdan 15’i (%57,8) FSC-8 (-AA) homozigot ya da heterozigot olan grupta görülmüştü. Çalışmamızda FSC-8 (-AA) homozigot saptanan Xmn 1 (-/-) hastaların hepsi TM kliniği göstermekteydi. FSC-8 (-AA)/IVSI-110 (G>A) birleşik heterozigotluğu olan hastalar birlikteliğinde Xmn 1 (-/+) olması durumunda TM kliniği verirken, Xmn 1(+/+) ile birliktelik gösteren bir hastada Tİ kliniği görülmüştür. Çalışmamızda IVSII-1 (G>A) homozigot olup Xmn 1 (+/+) saptanan 3 hasta da Tİ kliniğiyle takip edilirken, Xmn 1 (-/-) saptanan 2 hasta TM kliniğiyle takipliydi. IVSII-1 (G>A)/IVSI-110 olan 2 hastadan birinde TM, diğerinde Tİ kliniği vardı. Tİ kliniği veren hastada XmnI (-/+) saptanmıştı. IVSII-1/ -30 (T>A) birlikteliği saptanan bir hasta ise Tİ kliniği ile takip edilmekteydi. IVSII-1 (G>A) alleli taşıyan hastalar, çalıştığımız genetik değişiricilerden herhangi birini taşıdıklarında (eşlik eden ılımlı  $\beta^0$  mutasyonu,  $\alpha$  talasemi mutasyonu veya Xmn 1(+/+)), Tİ olarak takipli oldukları görülmüştür.

Çalışmamızdaki 3 genetik değişiriciyi kullanarak her bir değişirici allel için 1 puan vererek değerlendiren Ratip ve ark çalışmalarında 2 veya daha fazla genetik değişirici alel olması durumunda TI fenotipinden şüphelenilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Buna karşın bizim çalışmamızda tek değişirici alelde bile TI gelişiminden şüphelenmek gerektiği düşünülmüştür (25). Badens ve arkadaşları ise, bizim çalışmada kullandığımız genetik değişiricilere ek olarak BCL11A’da 2 SNP, HBS1L-cMYB’de 2 SNP de çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda hastalarda genetik değişirici alellerin skorlarına göre skoru 0 olan bütün bireylerin TM olduğunu, skoru 5 ve 6 olanların ise hepsinin talasemi intermedia olduğunu saptamışlardır (26). Bizim çalışmamızda da ılımlı  $\beta^0$  mutasyonlar dahil edildiğinde skor 3’ün üzerinde olan hastaların neredeyse tamamının TI fenotipinde olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada youden indekse göre saptanan ‘cut off’ değerinin 1 olmasıyla Tİ’nin tahmin edilebilirliği % 80,8 sensitivitede ve % 81 spesifitede bulunmuştur. Skorlamaya ılımlı  $\beta^0$ ’ları dahil edince ve

her  $\beta 0$  alele 1 puan verildiğinde yine 'cut off' değeri 1 olunca Tİ tahmin edilebilirliği açısından sensitivite % 88,5 spesifite % 67,2 olarak saptanmıştır. Bu sonuç da tek bir alel bile ılımlı fenotipi desteklediğini de Türk talasemi hastalarında talasemi intermedia fenotipi olma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir.

**Sonuç:** Genotip-fenotip ilişkisini belirleyen testler hastalığın seyri açısından bugün için ön fikir verebilmektedir.  $\beta$  talasemiye yol açan genetik değiştiricilerin daha ekonomik olarak saptanabileceği ve daha fazla değişkenin değerlendirilebileceği testlerin bulunması ile hastalığın genotipini ve genotip ilişkili fenotipini saptamak böylece talaseminin gidişatını öngörebilmek ve buna uygun stratejilerle hastalığı yönetmek daha uygun olacaktır.

**Çıkar çatışması:** yoktur

**Finansman desteği:** yoktur

## **KAYNAKLAR**

1. Weatherall DJ. Eds; Clegg. The Thalassemia syndromes JB. Historical perspectives. 4th Ed.Oxford; Blackwell Scientific UK, 2001: 1-55.
2. Günçağ D, Pekçelen Y, Atamer T. Talasemi. Ed: Günçağ D. Klinik Hematoloji. İstanbul; Nobel Matbaacılık, 2003: 137-47.
3. Canatan D, Aydınok Y. Talasemi ve Hemoglobinopatiler, Tanı ve Tedavi. Antalya; Retma Matbaacılık , Şubat 2007: 11-9.
4. Galanello R, Perseu L, Satta S, et al. Phenotype-genotype correlation in  $\beta$ -thalassemia. Thalassemia reports 2011;1:16-20.
5. Thein SL. Genetic modifiers of the Beta haemoglobinopathies. Brit J Haematol 2008;141:357-66.
6. Cao A, Galanello R. Beta-Thalassemia. Gene Reviews-NCBI bookshelf. Last update 2010.
7. Danjou F, Anni F, Perseu L et al. Genetic modifiers of beta thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. Haematologica 2012;97:989-93.
8. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. Nature Genetics 2007;39:1197-9.
9. Altay Ç. The frequency and distribution pattern of  $\beta$  thalassemia mutations in Turkey. Turk J Haematol. 2002;19:309-15.
10. Başak AN. The Molecular Pathology of  $\beta$ -Thalassemia in Turkey: The Boğaziçi University Experience. Hemoglobin 2007;31:233-41.

11. Nişli G, Kavaklı K, Aydmok Y, et al. Beta Thalassemia Alleles in Aegean Region of Turkey: Effect on clinical severity of disease. *Pediatr Hematol Oncol.* 1997;14:59-65.
12. Thein SL. Genetic insight into the clinical diversity of beta thalassemia. *Br J Haematol* 2004;124:264-74.
13. Neishabury M, Azarkeivan A, Najmabadi H. Frequency of positive XmnI Gamma polymorphism and coinheritance of common alpha thalassemia mutations do not show statistically difference between thalaseemia major and intermedia cases with homozygous IVS II-1 mutations. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;44:94-9.
14. Agouti I, Badens C, Abouyoub A, et al. Genotypic correlation between six common  $\beta$  thalassemia mutations and Xmn 1 polymorphism in the Moroccan population. *Hemoglobin*;31:141-9.
15. Aditya R, Verma IC, Saxena R, et al. Relation of Xmn 1 polymorphism and five common Indian mutations of thalassemia with phenotypic presentation in  $\beta$  thalassemia. *JK Sci.* 2006;8:139-43.
16. Bahadır A, Atalay EO. Frequency of G $\gamma$  promoter -158 (C>T) Xmn 1 polymorphism in Denizli, Turkey. *Int J Physic Sciences* 2012;7:1927-31.
17. Thadmouri GO. b-Thalassemia in Turkey: Distribtion, diversity, evolution and phenotype-genotype correlations. Doktora tezi. İstanbul 1999.
18. Nadkarni A, Gorashaker AC, Lu CY, et al. Molecular pathogenesis and clinical variability of  $\beta$  thalassemia syndromes among Indians. *Am J Hematol* 2001;68:75-80.
19. Oberoi S, Das R, Panigrahi I, et al. Xmn1-G $\gamma$  polimorphism and clinical predictors of severity of disease in  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:1025-8.
20. Mastropietro F, Modiano G, Cappabianca MP et al. Factors regulating HbF synthesis in thalassemic patients. *BMC blood dis.* 2002;2:1-7.
21. Verma IC, Kleanthous M, Saxena R, et al. Multicenter study of the molecular basis of thalassemia intermedia in different ethnic populations. *Hemoglobin* 2007;31:439-52.
22. Kılınc Y, Kümi M, Gürgey A, et al. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, G6PD enzim eksikliği ve HbS sıklığının araştırılması. *Doğa Tr Tıp Ecz D.* 1986;10:162.
23. Güvenç B, Yıldız SM, Tekinturhan F, et al. Molecular characterization of alpha thalassemia in Adana, Turkey: A single center study. *Acta Haematol.* 2010;123:197-200.
24. Colah R, Nadkarni A, Gorakshakar A, et al. Impact of  $\beta$  globin gene mutations on the clinical phenotype of  $\beta$  thalassemia in India. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;33:153-7.
25. Ratip DR S, Petrou H, Old JM, et al. Relationship between the severity of  $\beta$ - thalassemia syndromes and the number of alleviating mutations. *Europ J Hematol.* 1997;58:14-21.
26. Badens C, Joly P, Agouti I, et al. Variants in genetic modifiers of  $\beta$  thalassemia can help to predict the major or intermedia type of disease. *Haematologica* 2011;96:1712-5.
27. Kaddah N, Rizk S, Kaddah AM, et al. Study of Possible Genetic Factors Determining the Clinical Picture of Thalassemia Intermedia. *J med Sci.* 2009;9:151-5.