

TALASEMİ ve HEMOGLOBİNOPATİLERDE PRENATAL TANI

Uz. Dr. Özgür ÖZYÜNCÜ, Prof. Dr. M.Sinan BEKSAÇ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji Ünitesi

kbeksac@hotmail.com

Hemoglobin iki polipeptid zincirden oluşan tetramerik yapıda bir polipeptiddir. Heme proteini her zincire bağlıdır(Şekil 1). Hemoglobin tetramerlerinin oksijene affinitesi dokuya oksijen taşınabilmesi için değişiklik gösterir.

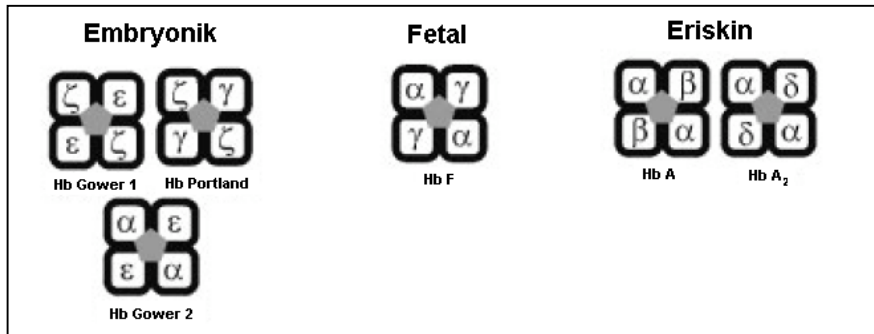
Normal erişkinde 3 çeşit hemoglobin vardır(Şekil 1);

HbA ($2\alpha + 2\beta$); Toplam hemoglobininin %95'i

HbA₂ ($2\alpha + 2\delta$); Toplam hemoglobininin %3.2-3.5'i

HbF ($2\alpha + 2\gamma$); Toplam hemoglobininin %1'inden azı

Fetal yaşam boyunca ise hemoglobininin büyük bir kısmı HbF şeklindedir. Embryonik dönemde sentezlenen hemoglobinler ise HbGower I, HbGower II ve HbPortland'dır(H).



Şekil 1: Hemoglobin türleri

HEMOGLOBİNOPATİLER

Genel olarak hemoglobinopatiler hemoglobin molekülünün yapısal anormallikleri (örneğin orak hücreli anemi) ve normal globin zincirlerinin sayısal anormallikleri (beta talasemi) olarak ikiye ayrılır¹.

1. Beta Talasemi

Hemoglobin (Hb) molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılmaması veya az miktarda yapılması ile karakterize olan ve otozomal resesif geçiş gösteren heterojen bir grup hastalığa talasemi adı verilmektedir. Beta globin zincirinin az yapılması (β^+) veya hiç yapılmaması ile giden talasemilere (β^0) beta talasemiler adı verilir². Normal erişkin hemoglobininin %95'i HbA olması nedeniyle α ve β globin zincirleri ile ilgili olan α ve β talasemiler klinik olarak önem kazanmaktadır. HbA₂ ve HbF yapısına giren delta ve gamma talasemiler ise klinik olarak gözlenmezler.

Alfa, beta, delta ve gamma talasemiler dışında delta ve beta globin genlerinin delesyonlarının birlikteliği ile giden delta-beta talasemiler ve gama, delta, beta gen delesyonları ile giden gama-delta-beta talasemiler de vardır³.

Beta globin zincir yapımından sorumlu olan beta gen kümesi 11 no'lu kromozomun kısa kolu üzerindedir. Beta talasemilerde moleküler defektler beta globin gen ekspresyonundaki basamaklarda olan defektler ve gen delesyonlarıdır³.

2. Alfa Talasemi

Alfa globin zincirinin yapılmasından sorumlu olan gen ise 16. Kromozomda bulunur. Bu gen üzerinde 2 zeta geni, 2 psödoalfa geni ve 2 alfa geni bulunur. Homolog kromozomların herbirinde iki alfa geni olmak üzere toplam 4 fonksiyonel alfa geni bulunmaktadır. Alfa talasemilerde tanımlanan moleküler defektler genelde gen delesyonlarıdır. Alfa talasemilerde 4 klinik sendrom tanımlanmıştır;

- a. Sessiz alfa talasemi taşıyıcılığı (alfa talasemi 2); dört alfa geninden birinde parsiyel veya tama yakın delesyon vardır. Klinik veya hematolojik olarak tamamen normaldirler.
- b. Alfa talasemi taşıyıcılığı (alfa talasemi 1); Aynı kromozom üzerinde iki veya farklı kromozom üzerinde birer alfa geninde parsiyel veya tama yakın delesyon vardır. Beta talasemi taşıyıcılarında görülen hematolojik bulgulara benzer bulgular vardır. Yenidoğan evresinde %5-10 HbBarts vardır fakat 6 ay sonra kaybolur.
- c. HbH Hastalığı; 4 alfa geninden üçünde parsiyel veya tam fonksiyonel bozukluk vardır. Klinik seyirleri genelde hafifitir ve hafif veya orta düzeyde hemolitik anemi ile kendini gösterir. Yenidoğan devresinde %20-40 oranında Hb Barts gözlenir daha sonra bunun yerini %5-30 oranında HbH alır.
- d. Hidrops fetalis; Dört alfa geninin dördünün de delesyonu sonucu HbBarts'a bağlı hidrops fetalis gözlenir. HbBarts'ın oksijene affinitesinin yüksek olması nedeniyle bebekler ya ölü doğar veya doğumdan birkaç saat için kaybedilir.

3. Orak Hücreli Anemi ve Varyantları

Anormal hemoglobinler arasında dünyada ve ülkemizde en sık rastlanan orak hücreli anemidir. Orak hücreli anemide beta globin gen dizisinin 6. kodonundaki nokta mutasyonu sonucu normalde glutamik asidi sentezleyen GAG kodonunda adenin yerine timin geçmesi sonucu GTG şifrelenir ve glutamik asit yerine valin şifrelenir³. HbS oksijen durumunda HbA gibi akıcı olduğu halde deoksi durumda kolloid hale geçer ve filamentler oluşturur. Asidoz, dehidratasyon, hipotermi ve kan viskozitesinde olan değişiklikler oraklaşmayı artırır. HbS molekülünde başlangıçta olan değişiklikler oksijen verilmesiyle geri döndürülebilir fakat tekrarlayan durumlarda membran değişiklikleri kalıcı hale gelir³. HbS'in neden olduğu klinik durumlar orak hücreli anemi ve orak hücreli anemi taşıyıcılığıdır.

Orak hücreli anemi taşıyıcılarında sadece bir HbS geni vardır(HbSA). Klinik olarak hiçbir bulgu vermezler. Kan sayımı ve mikroskopisi normaldir. Hemoglobin elektroforezde ise alfa zincirleri normaldir fakat beraberinde normal beta globin ile beraber mutasyon içeren beta globin gözlenir. Alfa zincirinin normal beta globin ile eşleşmeye olan eğilimi nedeniyle

elektroforezde muatsyon içeren hemoglobin oranı genelde %50'nin ve hatta %30'un altındadır³.

Orak hücre varyantlarından en sık gözlenen HbC'dir. HbC, beta globin sentezinde 6. kodonun ilk nücletid dizisinde G-A nokta mutasyonu nedeniyle ortaya çıkar. HbAC ve HbCC klinik olarak hafif seyreder fakat orak hücre ile bileşik heterozigosite durumlarında (HbSC) klinik daha ağırdır⁴.

Orak hücreli anemisi taşıyıcılarında beraberinde yaklaşık %10 oranında beta talasemi beraber gözlenebilir¹. Klinik beta globin zincirinin az olması(β^+) veya olmaması(β^0) durumunda değişkendir.

TARAMA

Mortalite ve morbiditesi yüksek olan talasemi majörün eradikasyonunda dünyaca önerilen en yaygın yöntem prenatal tanıdır. Hemoglobinopatili çocuk doğumları, her iki eşin de taşıyıcı olduğu ailelerin saptanması ve annelerin gebeliğin erken evrelerinde prenatal tanı için belirli merkezler başvurmaları ile sağlanabilir. Bu nedenle hemoglobinopati insidansının yüksek olduğu bölgelerde evlenecek çiftlerden en az biri talasemi ve orak hücreli anemi için taranmalıdır. Çiftlerden biri taşıyıcı ise diğeri de taranmalıdır.

Taramada Ultrasonografinin Yeri

Ailenin hemoglobinopatili bir çocuk sahibi olma olasılığı yüksekse aileye prenatal tanı önerilmelidir. Bu durumda genelde tanı direkt DNA analizi ile konulsa da ultrasonografinin özellikle alfa globin bozukluklarının taranmasında yeri olabilir. HbBart hastalığında ve HbH'de alfa globin zincirinin yokluğunda dolayı HbF azalır ve bu nedenle fetal anemi ortaya çıkar. Hidrops fetalis HbBart hastalığının bir bulgusudur fakat genelde 20. Gebelik haftasından sonra ortaya çıkar. Ultrasonografide hidrops 12-14 hafta arasında sadece %7'sinde, 17-18. Haftada ise %33'ünde belirgin olarak gözlenir⁵.

Plasenta kalınlığında artış hidrops gelişiminden önce ortaya çıkabilir. Ko ve ark⁶ yaptığı 51 etkilenmiş fetüsün incelendiği bir çalışmada 14-23 hafta arasında yapılan ultrasonografide plasental kalınlığın tüm vakalarda ortalama daha yüksek olduğu ve %90'ında 2 standart sapmadan daha yüksek olduğu gözlenmiştir⁶. Sınır değeri ortalama değerin 2 standart sapma üstü alındığında 12 hafta öncesinde sensitivitenin %72 spesifitenin ise %97 olduğu gözlenmiştir⁷. Sensitivite 12 hafta üzerinde %95 ve 18 haftanın üzerinde ise %100'e çıkmaktadır⁷. İkinci trimesterde plasental kalınlık ölçüldüğünde sınır değer 30mm kabul edilirse sensitivite %88.6, spesifite %90.2, pozitif prediktif değer %78.5 ve negatif prediktif değer ise %96.9 olarak hesaplanmıştır⁸.

İkinci trimesterin erken dönemlerinde doppler ultrasonografi ile kardiyak değişiklikler gözlenebilir. 12-13. Gebelik haftalarından itibaren anemiye bağlı olarak artmış kardiyak debi, ductus venosus dopplerinde ve orta serebral arter dopplerinde artmış akım hızı gözlenebilir⁹⁻¹¹. Kardiyak çevre ölçümünün torasik çevre ölçümüne bölünmesiyle elde edilen kardiyotorasik indeks kardiyomegaliyi belirlemede önemlidir. Sınır değer olarak 0.50 alındığında 18-20 hafta arasında kardiyotorasik indeksin HbBart hastalığını belirlemede sensitivitesinin %98.6 spesifitesinin %98.9 olduğu belirtilmiştir¹².

PRENATAL TANI

Hemoglobinopatilerde ilk prenatal tanı 1976 yılında Kan ve ark¹³ fetal fibroblastlardan elde DNA ile hibridizasyon yapılarak alfa talasemi tanısı konulmuş ve bu hastalıkların sık görüldüğü ülkelerde süratle uygulamaya girmiştir. Prenatal tanıda önceleri in vitro hemoglobin sentezi kullanılmış 1981 yılından itibaren DNA incelenmesi ile tanı konulmaya başlanmış ve 1986 yılından sonra otomatik PCR tekniğinin devreye girmesi ile DNA yöntemleri kullanılmış ve invitro hemoglobin sentezinin yerini almıştır¹⁴.

1. Fetal DNA Eldesi

a. Kordosentez

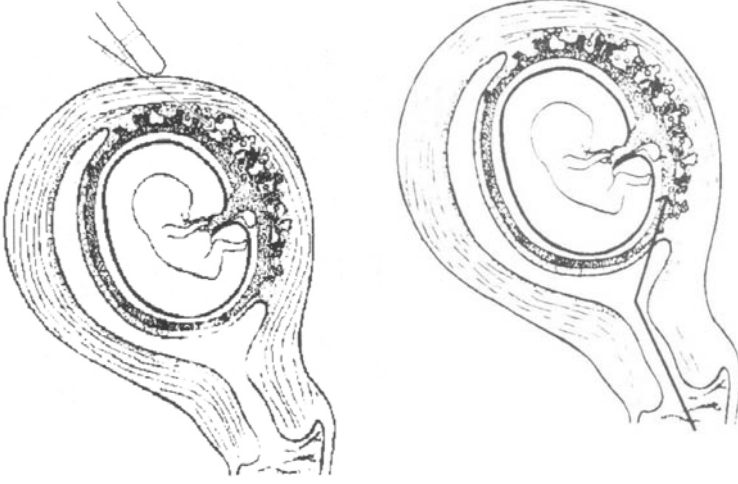
İn vitro hemoglobin sentezi için fetal kan gebeliğin 18-20. haftaları arasında ultrasonografi eşliğinde direkt kordosentez yöntemi ile alınmaktadır. Alınan fetal kan örneğinin anne kanı ile kontamine olup olmadığını anlaşıması için elektronik kan sayımı ve Kleihauer Betke tekniği ile fetal boyama yapılarak kanın fetal kan olduğu gösterilmelidir. Alınan fetal kan örneği H3-Leucine içeren ortamda enkübe edilir. Kolon kromatografisi ile hemoglobin alfa, beta ve gama globin zincirlerine ayrılır. Bu bölgelerdeki radyoaktivite oranlarına bakılarak fetüsün normal, taşıyıcı veya hasta olup olmadığına karar verilir. Normal fetüslerin çoğunda 16-24. Haftalarda beta/gama oranı 0.11 (0.06-0.10) iken beta talasemi majorda bu oran 0.02'den azdır. Halen mutasyonu bilinmeyen beta talasemi yanısıra alfa talasemi, deltabeta talasemi, alfabeta talasemi ve gebeliğin ilerlemesi nedeniyle mutasyon analizinin yapılamadığı durumlarda da in vitro hemoglobin sentezi ile tanı konulabilmektedir. Son yıllarda HPLC (High Performance Liquid Chromatography) tekniği kullanılarak prenatal tanı yapılabilmektedir.

b. Koryon Villus Örneklemesi

DNA yöntemleri ile prenatal tanı işlemi gebeliğin 9-12 gibi çok erken haftalarında ultrasound eşliğinde transservikal veya transabdominal kateter aracılığıyla koryon villus örnekleme (Chorion Villus Sampling – CVS) yapılarak konulabilir. Daha erken haftalarda işlem sonucu fetal anomali fetal kayıp riski artacağından yapılmaması önerilmektedir.

CVS transabdominal veya transvajinal olarak yapılabilir(Şekil 2). Her iki yöntemde de komplikasyon oranları birbirine yakındır fakat teknik olarak plasentanın uterus anterior duvarında veya fundal olduğu durumlarda transabdominal yöntemin, plasentanın posterior yerleşimli olduğu durumlarda ise transvajinal yaklaşımın daha etkilidir¹⁵.

CVS sonrası fetal kayıp riskinin amniyosenteze göre %1 daha yüksek olduğu bildirilse de 11-13 hafta arasında spontan fetal kayıp riskinin amniyosentez haftalarına göre daha yüksek olduğu hesaba katıldığında arada anlamlı bir fark gözlenmemektedir¹⁶. Kateterin tekrarlayan girişlerinde ise fetal kayıp riski artmaktadır. Transservikal yöntemde deneyimin genel olarak daha az olması nedeniyle fetal kayıp riskinin bir miktar daha yüksek olduğu gözlenmiştir¹⁶.



Şekil 2: Transabdominal ve transservikal koryon villus örnekleme¹⁷

Genelde ekstrasvaze fetal dokuların elde edildiği amniyosentezin aksine CVS'de elde edilen materyalde 3 major doku vardır. Elde edilen koryonik villusların en dış kısımda hormonal olarak aktif olan bir sinsityotrofoblast dokusu, ortada sitotrofoblast dokusu ve merkezde fetal kaynaklı fetal kapiller dokular vardır. Sitotrofoblastların artmış bir mitotik indeksi bulunmaktadır¹⁷. Prenatal tanı için gerekli olan ve kültüre edilen dokular merkezde bulunan fetal mezankimal dokulardır. Koryonik villusların sitogenetik analizlerinde %99.7 kesinlik gösterilirken sadece %1.1 hastada tanının doğrulanabilmesi için ek bir invaziv işleme gerek kalmaktadır¹⁸. Bu başarısızlığın nedeni genelde plasental mozaizm iken daha az olarak laboratuvar yetersizlik ve maternal hücre kontaminasyonudur.

CVS ile alınan örnekler mikroskop altında incelenip fetüs ve anneye ait hücreler birbirlerinden ayrılmakta ve daha sonra fetal örneklerden DNA izole edilerek DNA analiz yöntemleri uygulanmaktadır. Elde edilen doku az olursa kültüre edilerek çoğaltılabilir. Fakat bu durum kontaminasyon olasılığı arttırır. Bu işlem eğer fetüs hasta ise gebeliğin sonlandırılmasının gebeye vereceği stresin daha az olması ve 24-48 saat gibi oldukça kısa bir sürede sonuç vermesi nedeniyle in-vitro hemoglobin sentezine tercih edilen bir yöntemdir.

c. Amniosentez

Fetal DNA sadece kordosentez veya CVS'den değil amniosentez ile elde edilen fetal hücreler ve trofoblastlardan da elde edilebilmektedir ancak bu yolla doku örneğinden DNA gebeliğin 16-20. Haftaları gibi daha geç haftalarında elde edilebildiğinden CVS örneğinden elde edilen DNA'nın incelenmesi en tercih edilen uygulamadır. Amniosentez tercihen 15. Haftadan sonra uterus abdominal bir organ haline geldikten sonra uygulanmalıdır. 15-18. Haftalar arasında yaklaşık olarak 250-350mL amniyotik mayii vardır ve alınacak olan 20-30mL amniyotik sıvıdan yeterli miktarda yaşayan hücre elde edilebilir¹⁵. Prosedür ultrasonografi eşliğinde 20-22G iğne ile transabdominal olarak girilerek sıvının aspirasyonudur. İşleme bağlı olarak oluşabilecek gebelik kayıp oranı %0.5-1 arasında bildirilmektedir¹⁵.

d. Maternal kanda fetal DNA

Son olarak fetal DNA maternal plazmadan veya serumdan da elde edilebilir^{19,20}. Oldukça ilgi çeken bu invazif olmayan yöntemler henüz deneysel aşamadır ve üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Her prenatal tanı öncesinde parental fenotip ve genotip belirlenmeli ve sonrasında fetal değerlendirme yapılmalıdır. PCR yapılırken maternal kontaminasyon ve diğer DNA türlerinin amplifikasyonunu önlemek amacıyla sınırlı sayıda PCR siklusu (25-28) uygulanmalıdır²¹.

2. Fetal DNA İnceleme Yöntemleri

Hemoglobinopatilerin DNA analizde günümüzde kullanılan yöntemlerin hemen hemen hepsi Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na (PCR) dayanmaktadır²². Dolayısıyla mutasyon bir delesyon, nokta mutasyonu veya her ne olursa olsun spesifite kullanılan primerlere göre değişmektedir²¹. PCR kullanımı ile sekansların belirlenmesi için radyoizotopların kullanılmasına gerek kalmamış ve ayrıca gerekli olan DNA miktarında minimuma indirilmiştir. Tanıda kullanılan moleküler teknikler kitabın diğer bölümlerinde daha detaylı olarak anlatılacağından burada sadece genel bilgiler verilecektir. Hemoglobin tanısı için kullanılan PCR yöntemleri;

- Alel spesifik oligonükleotid (ASO) hibridizasyonu veya dot-blot analizi,
- Revers dot-blot analizi,
- Alel spesifik priming veya Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistem (ARMS) ,
- Restriksiyon enzim analizi,
- Amplifikasyon sonrası restriksiyon analizi,
- Mutajenik olarak ayrılmış PCR ve
- Gap-PCR'dir.

Bu tekniklerin hepsi bilinen bir mutasyonu belirlemek için kullanılır. PCR eldesi içerisinde bulunamayan mutasyonları taramak için ise "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE) ve tek sıralı DNA konformasyon Polimorfizmi (SSCP) kullanılabilir. İki teknikte de mutant olan PCR eldesinin jel üzerinde mobilitesinin değişmesine bağlı olarak belirlenmesine dayanan tekniklerdir. Mutasyon olduğu belirlenir ve sonrasında nedeni bulmak için diğer teknikler kullanılır. Sık gözlenen hemoglobinopatiler için kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir ve Tablo 1'de özetlenmiştir. Daha nadir gözlenen hemoglobinler ve varyantları için kullanılan tanı yöntemleri yine Tablo 1'de gösterilmiştir.

a. Beta talasemi sendromlarında moleküler tanı yöntemleri

Beta talasemi'ye neden olan yaklaşık 200 adet mutasyon olmasına rağmen sık gözlenen bölgelerde yaklaşık 20 tanesi %1 frekansın üzerinde gözlenir²³. Asya yerlilerinde gözlenen beta talasemilerin %20'sinden sorumlu olan 619 bp delesyonu²⁴ hariç diğerlerinin hemen hemen hepsi tek baz değişimi veya insersiyonu ile oluşan nokta mutasyonlar sonucu ortaya çıkar²⁵. Mutasyonların hepsi beta globin geninin kendisinde veya yakın bölgelerinde olmakta ve PCR yöntemleri ile belirlenebilmektedir²¹.

Beta talasemi mutasyonlarının belirlenmesindeki strateji öncelikle en sık gözlenen mutasyonların PCR ile taranmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan PCR tekniği Allel spesifik priming (ARMS) ve revers dot-blot analizidir. RFLP sınırlı sayıda mutasyon için kullanılır. Bu tekniklerle mutasyonların %90'ına ulaşılabilir. Yine bu amaçla DGGE ve SSCP gibi basit yöntemler ile mutasyon varlığı belirlenebilir. Ardından genelde mutasyonun yerini belirlemek için çoğaltılmış PCR eldesinde direkt sekans analizi yapılır²¹. Mutasyonların çok değişken olmadığı bölgelerde tarama yapılmadan direkt olarak DNA sekans analizi yapılması uygun bir yaklaşım olabilir.

b. Alfa talasemi sendromlarında moleküler tanı yöntemleri

Genelde nokta mutasyonları sonucu olan beta talasemilerin aksine alfa talasemi tek veya her iki alfa globin genlerinde olan delesyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu delesyonları belirlemede gap-PCR yöntemi oldukça başarılıdır. Kullanılan primerler çoğaltılabilir ve değişik delesyonları belirlemede kullanılabilir^{26,27}.

c. Orak hücreli anemi sendromlarında moleküler tanı yöntemleri

HbS ve diğer orak hücre varyantlarının tanısı PCR yöntemleriyle kolaylıkla tanınabilir. En sık kullanılan yöntem restriksiyon analizi olsa da ARMS, ASO hibridizasyon ve direkt sekans analizi ile de belirlenebilir.

3. Preimplantasyon Genetik Tanı

Talasemide preimplantasyon prenatal tanı uygulaması ilk kez 1998 yılında bildirilmiştir. Bu yöntem ile maturasyon gösteren fertilize oositlerden 1. Ve 2. Polar cisimcikler alınarak veya 3. Gün embriyodan hücre alınarak PCR tekniği ile hastalıklı olmayan embriyolar implante edilmektedir. Etik, legal ve sosyal nedenlerle abortusa gidilemeyen riskli gebeliklerde bu yöntem uygulanabilir fakat henüz çok kısıtlı sayıda merkez tarafından yapılmakta olup henüz rutin uygulamaya girmemiştir³.

Tablo 1: Klinik olarak önemli hemoglobinopatilerde mutasyon tipleri ve moleküler tanı yöntemleri (C)

Hemoglobinopati	Mutasyon tipi	Uygulanabilir teknikler
β -Talasemi	Nokta mutasyon	ARMS-PCR ASO Restriction digest Direct sequence analysis Gap-PCR
α -Talasemi	Delesyon	Gap-PCR Southern blotting
	Non-delesyon	Restriction digest ARMS-PCR ASO Direct sequence analysis
Hb S variant	Nokta mutasyon	ARMS-PCR Restriction digest Direct sequence analysis
Hb C variant	Nokta mutasyon	ARMS-PCR Direct sequence analysis
Hb E variant	Nokta mutasyon	ARMS-PCR Restriction digest Direct sequence analysis

KAYNAKLAR

- Rappaport VJ, Velazquez M, Williams K. Hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004;31:287-317, vi.
- Gümrük F, Altay Ç. Talasemiler. *Hacettepe Katki Dergisi.* 1995;16:7-326.
- Gümrük. F. Hemoglobinopatiler; Orak hücreli anemi. In: Beksaç. MS, Demir N, Koç A, Yüksel A, eds. *Obstetrik, Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji.* 1st ed. Ankara: MN Medikal & Nobel; 2001:401-408.
- Maberry MC, Mason RA, Cunningham FG, Pritchard JA. Pregnancy complicated by hemoglobin CC and C-beta-thalassemia disease. *Obstet Gynecol.* 1990;76:324-7.
- Lam YH, Ghosh A, Tang MH, Lee CP, Sin SY. Second-trimester hydrops fetalis in pregnancies affected by homozygous alpha-thalassaemia-1. *Prenat Diagn.* 1997;17:267-9.
- Ko TM, Tseng LH, Hsu PM, Hwa HL, Lee TY, Chuang SM. Ultrasonographic scanning of placental thickness and the prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassaemia 1 in the second trimester. *Prenat Diagn.* 1995;15:7-10.
- Ghosh A, Tang MH, Lam YH, Fung E, Chan V. Ultrasound measurement of placental thickness to detect pregnancies affected by homozygous alpha-thalassaemia-1. *Lancet.* 1994;344:988-9.
- Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S. Placental thickness at mid-pregnancy as a predictor of Hb Bart's disease. *Prenat Diagn.* 1999;19:1027-30.

9. Lam YH, Tang MH. Middle cerebral artery Doppler study in fetuses with homozygous alpha-thalassaemia-1 at 12-13 weeks of gestation. *Prenat Diagn.* 2002;22:56-8.
10. Lam YH, Tang MH, Tse HY. Ductus venosus Doppler study in fetuses with homozygous alpha-thalassaemia-1 at 12 to 13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;17:30-3.
11. Lam YH, Tang MH, Lee CP, Tse HY. Cardiac blood flow studies in fetuses with homozygous alpha-thalassaemia-1 at 12-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;13:48-51.
12. Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal sonographic cardiothoracic ratio at midpregnancy as a predictor of Hb Bart disease. *J Ultrasound Med.* 1999;18:807-11.
13. Kan YW, Golbus MS, Dozy AM. Prenatal diagnosis of alpha-thalassaemia. Clinical application of molecular hybridization. *N Engl J Med.* 1976;295:1165-7.
14. Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat.* 2005;26:399-412.
15. Eisenberg B, Wapner RJ. Clinical proceduress in prenatal diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16:611-27.
16. Evans MI, Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic procedures 2005. *Semin Perinatol.* 2005;29:215-8.
17. BEKSAÇ MS. Fetal Tan_da_nvaziv Yöntemler, Koryon Villus Örneklemesi. In: BEKSAÇ MS, ed. *Fetal T_p Prenatal Tan_.* Ankara: Medikal Network & Nobel; 1996:66.
18. Ledbetter DH, Martin AO, Verlinsky Y, Pergament E, Jackson L, Yang-Feng T, Schonberg SA, Gilbert F, Zachary JM, Barr M, et al. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162:495-501.
19. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
20. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002;360:998-1000.
21. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol.* 2004;26:159-76.
22. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-4.
23. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11:1-51.
24. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesan R, Weatherall DJ. The spectrum of beta-thalassaemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. *Br J Haematol.* 1991;78:242-7.
25. Thein SL. Beta-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11:91-126.
26. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassaemia. *Blood.* 2000;95:360-2.
27. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassaemia. *Blood.* 2001;98:250-1.