

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TALASEMİ MAJOR HASTALARINDA
APOLİPROTEİN E POLİMORFİZMİNİN
SOL VENTRİKÜL DİYASTOLİK DİSFONKSİYONU
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. SELAHATTİN SERT

DANIŞMAN: DOÇ. DR. SİMİN ROTA

2005-DENİZLİ

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU



Üye : Prof. Dr. Aziz POLAT



Üye : Doç. Dr. Simin ROTA

Üye : Doç. Dr. Süleyman DEMİR



Üye : Yrd.Doç. Dr Hülya AYBEK



Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sürecinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Doç. Dr. Simin ROTA'ya, uzmanlık eğitimimdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Diler ASLAN'a, Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU'na, Doç. Dr. Süleyman DEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Hülya AYBEK'e, Yrd. Doç. Dr. Yaşar ENLİ'ye; arkadaşlarım Uz. Dr. Gamze CAN YILMAZTÜRK'e, Uz. Dr. İlker GÖÇHAN'a, Uz. Dr. Sezgin TEKİNTÜRK'e, Dr. Mehmet TÜRK'e, Dr. Murat ÇELİKER'e, Dr. Ramazan AKBAY'a, Dr. Funda ERCAN'a, Dr. Şahika ÖZEN'e, Dr. Ertan DARIVERENLİ'ye, Dr. R. Didem PINARBAŞILI'ya, Güllü HEYBELİ'ye, Sibel ŞEN'e, Emine ÇETİN'e; tezime katkılarından dolayı Prof. Dr. Aziz POLAT'a, Uz. Dr. Murat İNAN'a, Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e, Dr. Ömür KURU'ya, Halk Sağlığı AD öğretim üyesi Dr. Özgür SEVİNÇ'e, Biyoistatistik AD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Beyza Akdağ'a; destek ve anlayışlarından dolayı SERT ve TAVAS ailelerine; en büyük desteğim olan, hayatımın en güzel hediyesi Yağmur SERT'i dünyaya getiren sevgili eşim Dr. Feride SERT'e; teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
1. Lipoproteinler	3
2. Apolipoproteinler	4
3. Apolipoprotein E	5
3.1 Apolipoprotein E'nin Yapısı	7
3.2 Apolipoprotein E'nin İşlevleri	10
3.3 ApoE'nin Lipoprotein Metabolizmasındaki Rolü	11
4. Apolipoprotein E Gen Polimorfizmi	13
4.1 ApoE Allel Sıklığı	14
4.2 ApoE İzoformlarının Lipid Seviyelerine Olan Etkisi	14
4.3 ApoE4 ve Artmış Kalp Hastalığı Riski	15
4.4 ApoE ve Ateroskleroz	16
4.5 ApoE Gen Polimorfizminin Alzheimer Hastalığındaki Rolü	16
4.6 Apolipoprotein E'nin Diğer Roller	17
4.6.1 ApoE ve İmmün Sistem Düzenlenmesi	17
4.6.2 ApoE ve Enfeksiyon Hastalıkları	18
4.6.3 ApoE'nin Diğer Olası Roller	18
5. Talasemiler	19
5.1. Hemoglobinin Yapısı	19
5.2. Dağılım ve Sıklık	20
5.3. Beta Talasemiler	20
5.3.1. Talasemi Minima	20
5.3.2. Heterozigot Beta Talasemi (β -Talasemi Minör)	21
5.3.3. Talasemi İntermedia	21
5.3.4. Homozigot Beta Talasemi (β -Talasemi Major)	21
5.4. Beta Talasemi Major'da Tedavi	23
5.4.1. Hipertransfüzyon Tedavisi	23
5.4.2. Demir Şelasyonu	23
5.4.3. Vitamin Desteği	23
5.4.4. Splenektomi	24
5.4.5. Kemik İliği Transplantasyonu	24
6. Demir Metabolizması	24
7. Hemokromatozis	27
GEREÇ VE YÖNTEM	28
BULGULAR	38
TARTIŞMA	46
SONUÇLAR	56
ÖZET	58
SUMMARY	60
KAYNAKLAR	62

TABLolar ÇİZELGESİ

	SAYFA
Tablo I: Temel insan plazma apolipoproteinlerinin sınıflandırılması	4
Tablo II: ApoE izoformlarının polimorfik bölgedeki kodon ve karşılık gelen amino asitleri	9
Tablo III: Normal bir erişkinde demirin organizmadaki dağılımı	24
Tablo IV: PCR karışımı hazırlanması	34
Tablo V: ApoE çoğaltma programı	34
Tablo VI: Talasemi major ve kontrol gruplarının yaş, boy ve ağırlıklarının karşılaştırılması	38
Tablo VII: Talasemi major grubundaki hastaların hematolojik parametreleri	38
Tablo VIII: Talasemi major ve kontrol gruplarında apoE genotip dağılımları	39
Tablo IX: Talasemi major ve kontrol gruplarında genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıklarının karşılaştırılması	39
Tablo X: Talasemi major ve kontrol gruplarında apoE allel sıklıklarının dağılımı	40
Tablo XI: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major bireyleri ile sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan talasemi major ve kontrol grubu bireylerinin, apoE genotip sıklıklarının dağılımı	41
Tablo XII: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren bireylerin sıklıklarının karşılaştırılması	41
Tablo XIII: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, apoE allel sıklıklarının karşılaştırılması	42
Tablo XIV: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin apoE genotip sıklıklarının dağılımı	43
Tablo XV: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıklarının karşılaştırılması	43
Tablo XVI: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin, apoE allel sıklıklarının dağılımı	44
Tablo XVII: Talasemi major olan hastalarda, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan bireylerin ferritin düzeylerinin karşılaştırılması	44
Tablo XVIII: Talasemi major olan hastalarda genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin ferritin düzeylerinin karşılaştırılması	45
Tablo XIX: Yunan, İtalyan toplumları ve Denizli ilindeki talasemi major hastalarının apoE allel sıklık dağılımları	51
Tablo XX: Yunan, İtalyan toplumları, Denizli ili ve Türkiye'de yapılan bazı çalışmalardaki kontrol bireylerinin apoE allel sıklık dağılımları	51

Tablo XXI: Yunan toplumunda, kardiyak fonksiyonlarına göre talasemi major ve kontrol grubunda apoE allel sıklıkları dağılımı	52
Tablo XXII: İtalyan toplumunda, kardiyak fonksiyonlarına göre talasemi major ve kontrol grubunda apoE allel sıklıkları dağılımı	53
Tablo XXIII: Çalışmamızda; sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, apoE allel sıklıklarının dağılımı	53

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	SAYFA
Şekil 1: Lipoproteinlerin yapısı	3
Şekil 2: ApoE izoformlarını kodlayan genin 19. kromozom üzerinde gösterilmesi	5
Şekil 3: İnsan apoE geninin yapısı	6
Şekil 4: ApoE3'ün amino asit dizesi	6
Şekil 5: ApoE'nin yapısı	7
Şekil 6: ApoE'nin amino-uç kısmının 3 boyutlu yapısı	8
Şekil 7: ApoE'de izoform farklılıklarını belirleyen bölgelerin üç boyutlu yapısı	9
Şekil 8: ApoE aracılı plazma lipoprotein metabolizması	12
Şekil 9: ApoE izoformlarının apoE, apoB, plazma trigliserid, total ve LDL kolesterol seviyeleri üzerindeki etkileri	15
Şekil 10: Hemoglobinin yapısı	19
Şekil 11: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları	27
Şekil 12: PCR sonrası 227 baz çiftlik çoğaltılmış ürünler	35
Şekil 13: %12'lik poliakrilamid jelde Hhal kesim ürünleri	36

GİRİŞ

Talasemiler, hemoglobinin polipeptid zincirlerinden bir veya daha fazlasının sentezinde azalma ya da hiç yapılmaması sonucunda ortaya çıkan hematolojik bozukluklardır. Günümüzde talasemiler; kusurlu sentezlenen hemoglobin polipeptid zincirine göre alfa (α), beta (β), delta beta ($\delta\beta$), delta (δ) ve gama delta beta ($\gamma\delta\beta$) talasemiler olarak sınıflandırılmaktadırlar (1).

Ülkemizde en sık görülen talasemi tipi, beta talasemidir (2). Beta talasemi major hastalarında kesin tedavi kemik iliği transplantasyonudur. Kemik iliği transplantasyonu için donörü olmayan hastalarda güncel tedavi yaklaşımı kan transfüzyonları ve kan transfüzyonlarının komplikasyonu olarak gelişen demir yüklenmesini ortadan kaldırmak için desferrioksamin şelasyon tedavisidir. Hastaların çoğunda, gerek yapılan kan transfüzyonlarına, gerekse gastrointestinal sistemden artmış demir emilimine bağlı olarak oluşan kronik ve aşırı demir birikimi nedeni ile dalak, kemik iliği, karaciğer, endokrin bezler, kalp gibi hemen hemen tüm organlarda işlev bozuklukları gelişmektedir (3). Talasemi major hastalarında, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yolu ile plazmada transferrine bağlı olmayan demir, hidroksil (OH^*) radikallerinin oluşumu ile oldukça toksik bir etki meydana getirmektedir (4-8). Kalpte, serbest radikaller ve antioksidan mekanizma arasındaki dengesizlik mitokondri iç zarındaki elektron taşıma zincirinde de bozulmaya neden olmakta, bu da klinik olarak ölümcül kardiyomiyopati olarak gözlenen anormal enerji metabolizması ile sonuçlanmaktadır (5, 9).

Talasemi major hastalarında en sık ölüm nedeni kardiyak komplikasyonlardır (10). Bu hastalarda erken dönemde diyastolik, geç dönemde sistolik kalp yetmezliği gelişmektedir (11, 12). Düzenli tedavi edilemeyen olgular, ortalama ikinci on yılda kalp yetmezliği, disritmiler, miyokardit, perikardit gibi kalp kaynaklı komplikasyonlar nedenleri ile kaybedilmektedirler (13).

Talasemi major hastalarında kardiyak komplikasyonların gelişimi, birçok nedene bağlı olmakla birlikte en önemli neden sekonder hemokromatozistir. Şelasyon tedavilerinden hastaların çoğu yarar görse de, tedaviye rağmen bazı hastalarda organ yetmezliği gelişmekte ve hastalar organ yetmezlikleri nedeniyle ölmektedirler (1).

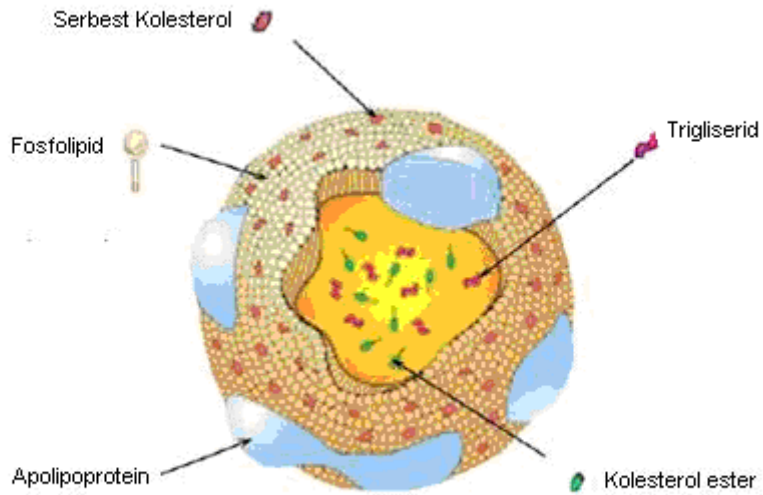
ApoE izoformlarının beta talasemili major hastalarında sol kalp yetmezliği gelişimi için bir risk faktörü olabileceği görüşü öne sürülmektedir (14, 15). Türk toplumunda, talasemi major hastalarını, apoE polimorfizmi açısından değerlendiren bir çalışma tespit edilmemiştir.

Bu çalışmadaki amacımız; Denizli ilindeki beta talasemi major hastalarında apoE polimorfizm sıklığını saptayarak, bu hastalarda en sık ölüm nedeni olan kardiyak fonksiyon bozukluğu ile apoE polimorfizmi arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1. LİPOPROTEİNLER

Lipidler, organik bileşiklerin heterojen bir grubudur. Lipidler, polar olan ve polar olmayan olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Polar lipidler, sınırlı da olsa suda çözünebilme özelliği gösterirler. Bu grup içerisinde kolesterol, yağ asitleri, glikosfingolipidler, gliserofosfolipidler yer alır. Polar olmayan lipidler ise, trigliseridler (triacilgliserol) ve kolesterol esterleridir (16-18). Hidrofobik özellikleri nedeni ile polar olmayan lipidlerin plazmada taşınmaları “lipoproteinler” olarak adlandırılan özel karmaşık yapılar sayesinde mümkün olur. Tüm lipoproteinlerin temel yapısı benzer olup, kolesterol esterleri ve trigliseridleri içeren, nötral lipidlerden oluşan bir gövdeye ve daha polar yağlardan (esterleşmemiş kolesterol ve fosfolipidler) ve apolipoproteinlerden oluşan bir dış tabakaya sahiptirler. İçerdiği lipidler nedeni ile hücrelerin plazma zarına benzeyen ve örtücü bir yapı oluşturan dış tabaka, sıvı plazma ile içteki polar olmayan lipid gövde arasında, bir ara tabaka olarak iş görür. Böylece, bu polar yüzey, plazmadaki aşırı derecede çözünmez nitelikte olan kolesterol esterleri ve trigliseridlerin bir yerden başka bir yere taşınmasını sağlar (19-22) (Şekil 1).



Şekil 1: Lipoproteinlerin yapısı.

Lipoproteinler, dansite gradyent ultrasantrifügasyon yöntemi ile ayırt edilerek sınıflandırılmışlardır. Başlıca beş sınıfa ayrılırlar (16-18):

1. Şilomikronlar
2. Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)
3. Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)
4. Ara yoğunluklu lipoproteinler (IDL)
5. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

2. APOLİPOPROTEİNLER

Lipoproteinlerin yapısında yer alan proteinlere “apolipoprotein” denmektedir. Apolipoproteinlerin önemli işlevleri arasında; polar olmayan lipidlerin çözünmesine yardımcı olmak, lipoprotein metabolizmasındaki önemli enzimlerin aktivasyonuna katılmak, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak lipoproteinlerin alınımını ve yıkımını sağlamak sayılabilir (23). Apolipoprotein çeşitleri ve temel işlevleri Tablo 1’de verilmiştir:

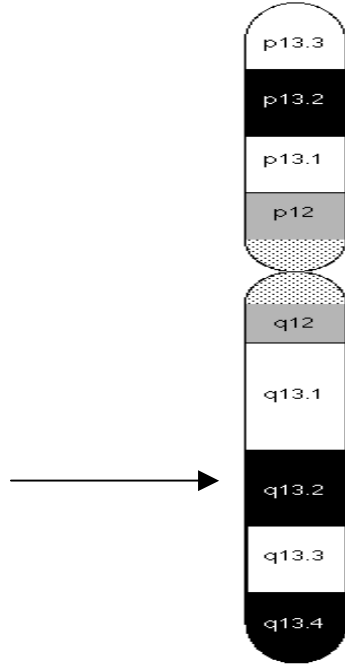
Tablo 1: Temel insan plazma apolipoproteinlerinin sınıflandırılması (24).

Apolipoprotein	Taşındıkları Lipoprotein(ler)	Üretim yeri	Temel İşlev
A-I	Şilomikron, HDL	İnce bağırsak, Karaciğer	Yapısal protein, lesitin kolesterol açıltransferaz (LCAT) kofaktörü.
A-II	HDL	İnce bağırsak, Karaciğer	Bilinmiyor.
A-IV	Şilomikron, HDL	İnce bağırsak, Karaciğer	Lipoprotein lipaz ve LCAT aktivatörü.
B48	Şilomikron	İnce bağırsak	Bağırsaktan trigliserid salınımı.
B100	VLDL, IDL, LDL,	Karaciğer	Karaciğerden trigliserid salınımı, LDL reseptörü ligandı.
C-I	Şilomikron, VLDL, HDL	Karaciğer	LCAT aktivasyonu (?).
C-II	Şilomikron, VLDL, HDL	Karaciğer	Lipoprotein lipaz kofaktörü.
C-III	Şilomikron, VLDL, HDL	Karaciğer	Apo C-II inhibisyonu; lipoprotein lipaz aktivasyonu.
E	Şilomikron, VLDL, IDL, HDL	Karaciğer ve çevresel dokular	Şilomikron kalıntıları ve IDL alınımını kolaylaştırma.
Apo (a)	Lp(a)	Karaciğer	Bilinmiyor.

3. APOLİPOPROTEİN E

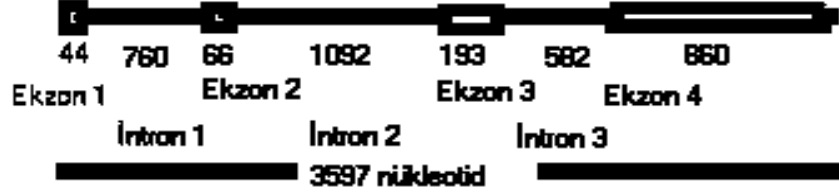
Apolipoprotein E (ApoE), 1970'li yılların başlarında trigliseridden zengin lipoproteinlerin (şilomikron, IDL ve VLDL) yapısında bulunan bir protein parçası olarak keşfedilmiş, kısa bir süre sonra da apoE'nin kolesterol metabolizmasında önemli bir yeri olduğu ortaya konmuştur (25).

ApoE moleküler ağırlığı ~34 kilodalton olan 299 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Başlıca; karaciğer, beyin, deri ve doku makrofajları tarafından sentez edilen apoE'nin E2, E3 ve E4 olmak üzere 3 izoformu vardır. Bu üç izoformu kodlayan gen, insanlarda 19. kromozomun uzun kolunda (19q13.2) bulunmaktadır (26) (Şekil 2).



Şekil 2: Apolipoprotein E izoformlarını kodlayan genin 19. kromozom üzerinde gösterilmesi (26).

3.6 kilobazlık apoE geninin, üç intronu ve dört ekzonu bulunmaktadır ve 317 amino asitten oluşan öncü proteini kodlamaktadır (25, 27) (Şekil 3).



Şekil 3: İnsan apoE geninin yapısı (28).

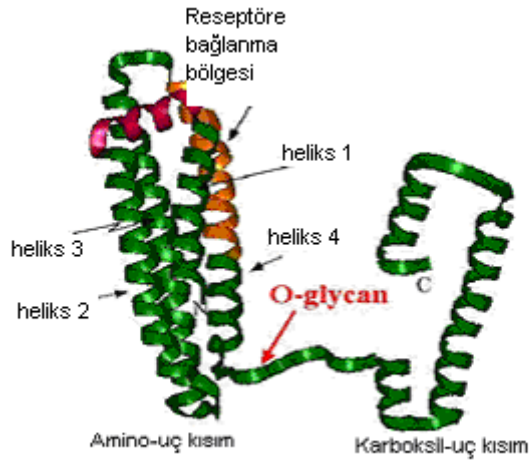
Öncü proteinin yapısında bulunan ve salgınım sinyali veren 18 amino asitlik prepropeptid, translasyon esnasında yapıdan ayrılmakta ve 299 amino asitlik apoE yapısı oluşmaktadır (25, 27, 28) (Şekil 4).

H₂N –Lys-Val-Glu-Gln-Ala-Val-Glu – Thr – Glu – Pro – Glu – Pro – Glu – Leu – Arg –Gln –Gln –Thr –Glu – Trp – Gln – Ser – Gly – Gln – Arg – Trp – Glu – Leu – Ala – Leu – Gly – Arg – Phe – Trp – Asp – Tyr – Leu Arg –Trp –Val –Gln –Leu –Ser –Glu –Gln –Val –Gln –Glu –Glu –Leu –Leu –Ser-Ser-Gln –Val –Thr –Gln –Glu –Leu –Arg –Ala –Leu –Met –Asp –Glu –Thr –Met –Lys –Glu –Leu –Lys –Ala –Tyr –Lys –Ser –Glu –Leu –Glu –Glu –Gln –Leu –Thr –Pro –Val –Ala –Glu –Glu –Thr –Arg –Ala –Arg –Leu –Ser –Lys –Glu –Leu –Gln –Ala –Ala –Gln –Ala –Arg –Leu –Gly –Ala –Asp –Met –Glu –Asp –Val –**Cys (112. aa)** –Gly –Arg –Leu –Val –Gln –Tyr –Arg –Gly –Glu –Val –Gln –Ala –Met –Leu – Gly –Gln –Ser –Thr –Glu –Glu –Leu –Arg –Val –Arg –Leu –Ala –Ser –His –Leu –Arg –Lys –Leu –Arg –Lys –Arg –Leu –Leu –Arg –Asp –Ala –Asp –Asp –Leu –Gln –Lys –**Arg (158. aa)** –Leu –Ala –Val –Tyr –Gln –Ala –Gly –Ala –Arg –Glu –Gly –Ala –Glu –Arg –Gly –Leu –Ser –Ala –Ile –Arg –Glu –Arg –Leu –Gly –Pro –Leu –Val –Glu –Gln –Gly –Arg –Val –Arg –Ala –Ala –Val –Gly –Ser –Leu –Ala –Gly –Gln –Pro –Leu –Gln –Glu –Arg –Ala –Gln –Ala –Trp –Gly –Glu –Arg –Leu –Arg –Ala –Arg –Met –Glu –Glu –Met –Gly –Ser –Arg –Thr –Arg –Asp –Arg –Leu –Asp –Glu –Val –Lys –Glu –Gln –Val –Ala –Glu –Val –Arg –Ala –Lys –Leu –Glu –Glu –Gln –Ala –Gln –Gln –Ile –Arg –Leu –Gln –Ala –Glu –Ala –Phe –Gln –Ala –Arg –Leu –Lys –Ser –Trp –Phe –Glu –Pro –Leu –Val –Glu –Ash –Met –Gln –Arg –Gln –Trp –Ala –Gly –Leu –Val –Glu –Lys –Val –Gln –Ala –Ala –Val –Gly –Thr –Ser –Ala –Ala –Pro –Val –Pro –Ser –Asp –Asn –His –**COOH**

Şekil 4: ApoE3'ün amino asit dizisi (28).

3.1 APOLİPOPROTEİN E'NİN YAPISI

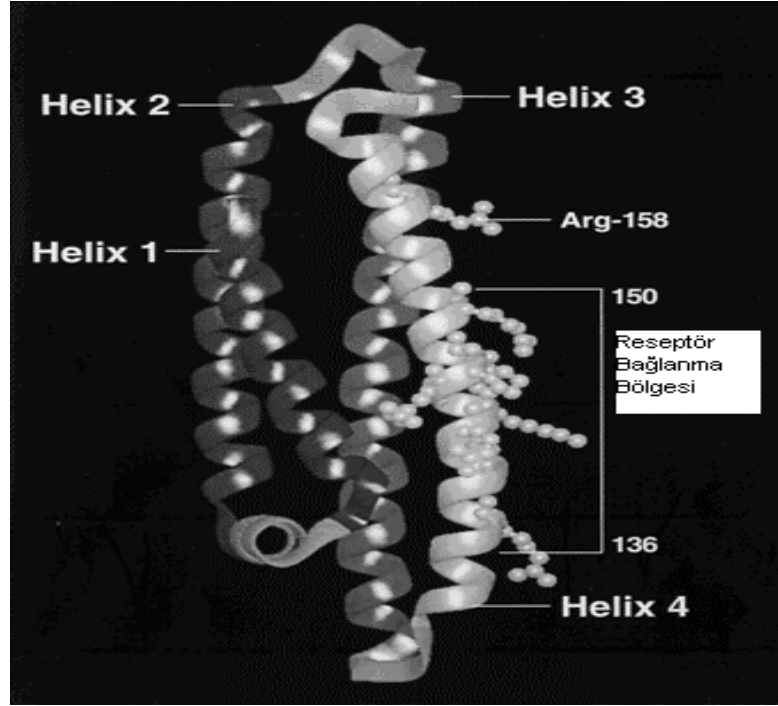
ApoE'nin birincil yapısının belirlenmesi, işlevleri hakkında birçok değişik görüşün öne sürülmesini sağlamıştır. Proteinin özgül bir bölgesi olan 136-150. amino asit dizeleri, özellikle bazik amino asitlerden zengindir. 136-150. amino asit dizelerinin reseptöre ve heparine bağlanma bölgesi olduğu gösterilmiştir. ApoE amino asit dizesinin karboksil ucunda, amfipatik α -heliksler oluşturan bölgeler bulunmaktadır. Amfipatik α -heliksler apoE'nin lipoproteinlere bağlanma bölgesini kapsamaktadır (25, 27, 29, 30) (Şekil 5).



Şekil 5: ApoE'nin yapısı (31).

ApoE'nin ikincil yapısı, birbirinden bağımsız iki kısımdan oluşmaktadır. Amino-uç kısım (1-191 aminoasitleri), reseptöre ve heparine bağlanma bölgelerini içerir. Karboksil-uç kısım (225-229 amino asitleri) ise, lipoproteinlere bağlanma bölgesini içeren ayrı bir kısımdır (32, 33).

ApoE'nin üçüncül yapısında, amino-uç kısım dört heliks demeti şeklinde görülmektedir: Heliks 1; 24-42. amino asit dizelerini, heliks 2; 54-81. amino asit dizelerini, heliks 3; 87-122. amino asit dizelerini, heliks 4; 130-164. amino asit dizelerini içermektedir (34). Ek bir kısa heliks (44-53. amino asit dizeleri) birinci ve ikinci heliksi bağlar. Dört heliks antiparalel olacak şekilde düzenlenmiştir. Reseptöre ve heparine bağlanma bölgeleri 4. helikste yer almaktadır (34-37) (Şekil 6) .

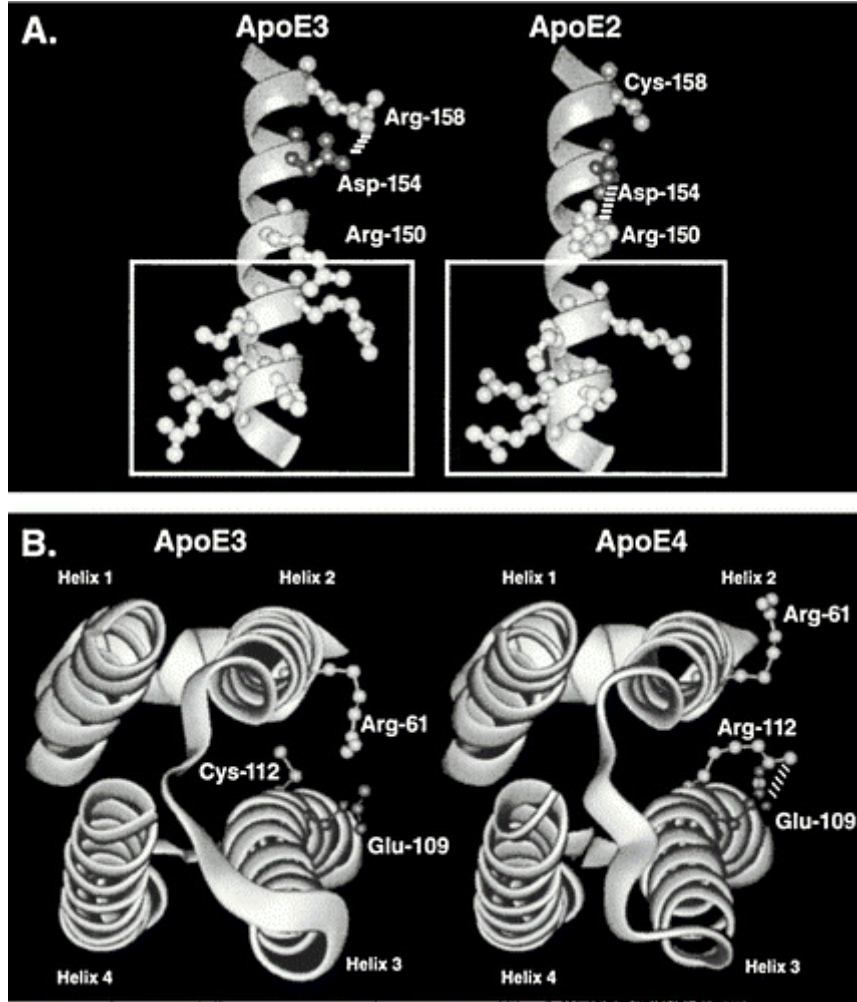


Şekil 6: ApoE'nin amino-uç kısmının 3 boyutlu yapısı (38).

Üç apoE izoformunun yapısı önemli değişkenlik göstermektedir. ApoE3'de 158. amino asit olan arjinin'in apoE2'de sistein ile yer değiştirmesi, 3. ve 4. heliksler arasındaki tuz köprülerini belirgin olarak değiştirir ve 140-150. amino asit dizelerindeki reseptör bağlayan bölgelerin pozitif iyon potansiyelini büyük ölçüde azaltır (35, 37). ApoE3'de 112. amino asit olan sistein'in apoE4'de arjinin ile yer değiştirmesi özgül rezidülerin yan zincirdeki konumunda belirgin kaymalara ve birkaç tuz köprüsünün yeniden düzenlenmesine sebep olur. ApoE4'de 112. konumda arjinin amino asidinin bulunması, 3. heliksteki 109. amino asit olan glutamik asit ile 112. amino asit olan arjinin arasında yeni bir tuz köprüsünün oluşmasına yol açar ve 2. helikte 61. amino asit olan arjinin yan zincirinin 2. helikse doğru yönelerek farklı bir konum almasına neden olur (36) (Tablo II, Şekil 7).

Tablo II. ApoE izoformlarının polimorfik bölgedeki kodon ve karşılık gelen amino asitleri (39) .

İzoform	112. Aminoasit	158. Aminoasit
E2	Cys (TGC)	Cys (TGC)
E3	Cys (TGC)	Arg (CGC)
E4	Arg (CGC)	Arg (CGC)



Şekil 7: ApoE’de izoform farklılıklarını belirleyen bölgelerin üç boyutlu yapısı (40).

3.2 APOLİPOPROTEİN E’NİN İŞLEVLERİ

ApoE'nin temel işlevlerinden birincisi olan reseptöre bağlanma işlevi, izoform özgülüğü göstermektedir. Deneysel çalışmalar, apoE3 ve apoE4'ün kültür hücrelerinde LDL'ye benzer ilgi ile bağlandığını; apoE2'nin ise, LDL'ye bağlanma yeteneğinin daha az olduğunu ortaya koymuştur (41, 42). ApoE2'deki 140-150. amino asit dizesindeki düşük pozitif iyon potansiyellerinin LDL'ye zayıf bağlanma aktivitesinin ana sebebi olduğu düşünülmektedir (43).

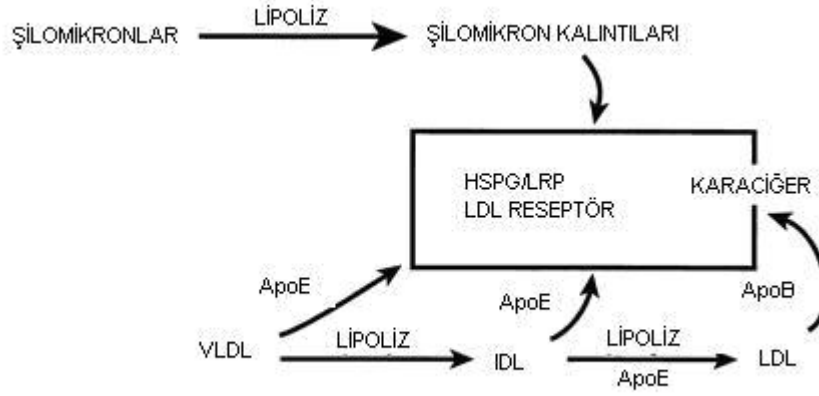
ApoE'nin temel işlevlerinden ikincisi olan hücre yüzeyindeki heparin ve heparan sülfat proteoglikanlara (HSPG) bağlanma işlevi, karaciğerdeki kalıntı lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. ApoE2'nin, apoE3 ve apoE4'den daha az HSPG'ye bağlandığı bildirilmektedir (44).

ApoE'nin temel üçüncü işlevi olan lipoproteinlere bağlanma işlevi de izoform özgülüğü göstermektedir. Karboksil uçtaki lipoprotein bağlayan bölge, 244 ve 272. amino asit dizeleri arasındaki amfipatik helikslerde bulunmaktadır ve bu bölge özellikle trigliseridden zengin lipoproteinlere (şilomikron, VLDL, IDL) bağlanmada önemli rol oynamaktadır. ApoE3 ve apoE2 genellikle daha küçük, fosfolipidden daha zengin HDL'ye bağlanırken; apoE4 genellikle daha büyük, trigliseridden zengin VLDL'ye bağlanır. İzoformlar arasındaki lipoproteinlere bağlanmadaki bu farklılığın, amino-uçlar ve karboksil-uçlar arasındaki etkileşim farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karboksil-uç kısmın lipoprotein bağlanma bölgesi içinde, glutamik asit 255 yan zinciri, apoE4'ün arjinin 61 yan zinciri ile tuz köprüsü oluştururken, apoE3 ve apoE2'de arjinin 61 yan zincirlerindeki yönelim farklılığından dolayı aynı tuz köprüsü oluşmamaktadır. "Alan etkileşimi" de denilen olay bir şekilde apoE4'ü VLDL'ye bağlanmaya yönlendirmektedir (36).

3.3 APOE'NİN LIPOPROTEİN METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

ApoE, lipoproteinlerin reseptörlerine bağlanmasında ligand görevi yaparak lipoprotein metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. ApoE, karaciğerden VLDL'nin bir parçası olarak sentezlenir. Daha sonra, plazmada şilomikronların yapısına taşınır. Şilomikronlar; kapillerde dolaşırken apoE'den zengin hale gelir, kapiller endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan lipoprotein lipaz'ın etkisiyle de trigliserid içeriğinin çoğunu kaybederler ve daha küçük çaplı şilomikron kalıntılarına dönüşürler. Bu yolla apoE; hem endojen trigliseridlerin ve VLDL kolesterolün hem de besinsel trigliserid ve şilomikronların metabolizmasında rol alır. Bu yapıların, VLDL ve kalıntıları aracılığı ile ekstrahepatik hücrelere veya şilomikron kalıntıları aracılığı ile karaciğere dağıtılmasında rol alır. Bu dokularda, besinsel yağ asitleri metabolize olur veya VLDL ile birlikte trigliserid olarak tekrar salınır. Bu durumda apoE “endokrin-benzeri” işlev gösterir. Lipidleri tekrar dokulara dağıtılması nedeniyle de lipid taşınması ve dağıtımında “parakrin-benzeri” işlevi de vardır (25, 28, 44, 45).

ApoE; lipid taşınması ve dağıtımını işlevini, başlıca iki reseptör aracılığı ile gerçekleştirir. Birinci reseptör yolu, hem hepatik hem de ekstrahepatik hücrelerdeki LDL reseptör yoludur. LDL reseptör ilişkili protein (LRP), LDL reseptör gen ailesi içinde çok büyük bir proteindir, apoE dahil birçok ligandı bağlar (46, 47). ApoE bu reseptör aracılığı ile, sadece yapılarında bulunduğu VLDL, VLDL kalıntıları (IDL) ve şilomikron kalıntıları düzeylerini değil, yapısında bulunmadığı LDL düzeylerini de düzenlemektedir (44, 48). İkinci reseptör yolu ise, heparan sülfat proteoglikan / LDL reseptör ilişkili protein (HSPG/LRP) yoludur. HSPG/LRP yolu, karaciğerde kalıntı lipoprotein metabolizmasında işlev görür (Şekil 8) (44, 49).



Şekil 8: ApoE aracılı plazma lipoprotein metabolizması (38).

Karaciğerde lipoproteinler çok basamaklı bir süreçle metabolize olurlar. İlk olarak lipoproteinler, apoE aracılığı ile HSPG'den zengin disse boşluklarında tutulurlar (bağlanma basamağı). Daha sonra, lipoprotein bağlı lipaz ile son lipolitik sürece girerler (işleme basamağı). Son olarak ya LDL reseptörü ile yada HSPG/LRP kompleksinin bir parçası olarak hücelere alınırlar (alınım basamağı) (44).

ApoE; lipoprotein metabolizmasını, reseptöre bağlanma özelliği ile ilişkisiz yollarla da etkiler. Lipoproteinlerin yüzeyindeki apoE birikimi, lipoproteinlerdeki trigliseridlerin lipazlar tarafından yıkılmasını belirgin olarak yavaşlatır (50-53). Tüm apoE izoformları trigliseridlerin hidrolize olmasını inhibe edebilse de, lipoproteinlerde bulunan apoE miktarına bağlı izoforma özgü farklılıklar görülür. Karaciğerde artan apoE sentezi ve salınımı veya plazmada apoE birikimi, artan VLDL sentezi ve salınımı ile ilişkili olduğundan; apoE, plazma trigliserid ve VLDL seviyelerini doğrudan da etkileyebilmektedir (51, 54, 55).

ApoE, HDL alt sınıflarının bir parçası olarak da, hücrelerden kolesterol çıkışı ve girişini etkilemektedir (ters kolesterol taşınması). Ters kolesterol taşınmasında, hücrelerdeki fazla kolesterol atılım için karaciğere taşınır. ApoE, HDL alt sınıflarının yapısına katıldıktan sonra karaciğere kolesterol taşınması için ligand görevi görür. HDL'deki fazla

kolesterol, kolesterol ester transfer proteini ile trigliseridden zengin lipoproteinler ve LDL'ye taşınarak karaciğere taşınır (48, 56).

4. APOLİPOPROTEİN E GEN POLİMORFİZMİ

1970'li yılların ortalarında Utermann ve ark. apoE'nin polimorfik özellikte olduğunu ve izoelektrik fokuslama ile saptanabilen birçok izoformlarının bulunduğunu ortaya koymuşlardır (57).

ApoE izoformlarının analizi, genetik olarak belirlenen ve belirlenemeyen iki çeşit apoE gen polimorfizmini ortaya koymaktadır. Genetik olarak belirlenen polimorfizm, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ allelleri ile oluşmaktadır ve apoE2, apoE3 ve apoE4 olarak üç apoE izoformu belirlenmiştir. Genetik olarak belirlenen izoformların yapıları 112. ve 158. amino asitlerde değişkenlik göstermektedir. ApoE3'de 112. amino asit sistein ve 158. amino asit arjinin iken, apoE4'de her iki konumda arjinin, apoE2'de ise, her iki konumda sistein yer almaktadır. Arjinin-sistein değişiklikleri, izoformlarda yük değişikliklerine neden olmaktadır (58). ApoE4 en katyonik olan izoformdur ve apoE3'ten bir yük, apoE2'den 2 yük farklılık göstermektedir. İnsanlarda üç homozigot (E2/2, E3/3, ve E4/4) ve üç heterozigot (E2/3, E2/4, ve E3/4) olmak üzere 6 apoE genotip çeşiti bulunmaktadır (59).

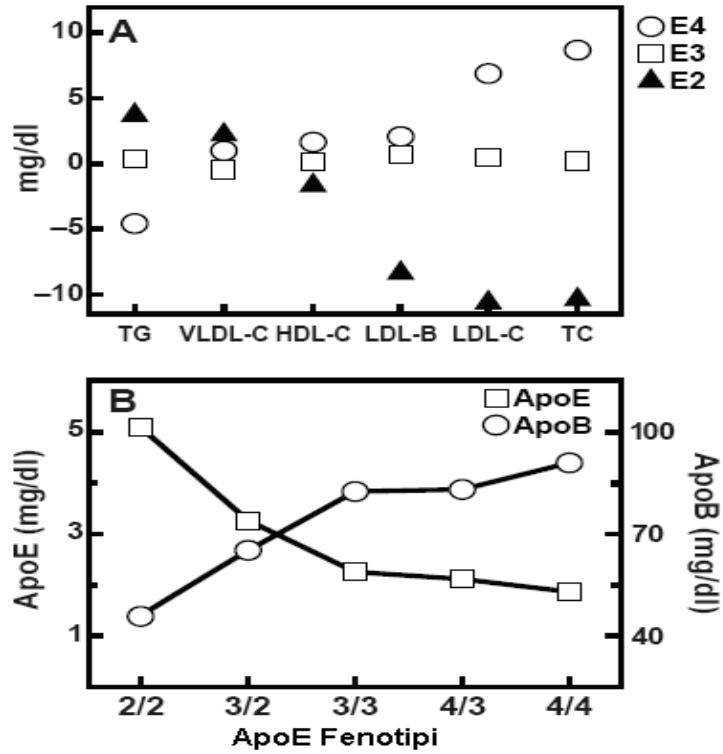
Genetik olarak belirlenemeyen ikinci apoE gen polimorfizmi ise, apoE'nin posttranslasyonel siyalizasyonu sonucu oluşmaktadır. Siyalik asit bağlanmış izoformlar, plazma apoE'sinin yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır (60).

4.1 APOE ALLEL SIKLIğI

ApoE izoformlarının normal toplumda lipid parametreleri üzerine olan etkisini gösteren toplum çalışmaları ile dünyadaki birçok coğrafi ve etnik grupların apoE allel sıklıkları hakkında bilgi edinilmiştir. Tüm toplumlarda en sık görülen allel, %50-90 sıklıkla ϵ 3 allelidir. ϵ 4 allel sıklığı %5-35 arasında iken; ϵ 2 allel sıklığı %1-15 arasındadır. Çoğu çalışmada ϵ 4 allel sıklığı, ϵ 2 allel sıklığından daha yüksek bulunmuştur. Altı apoE genotipinin sıklıkları yaklaşık olarak; E2/3 için %15, E3/3 için %55, E3/4 için %25'dir. E2/2, E2/4 ve E4/4 genotiplerinin her biri ise, %1-2 sıklıkta görülmektedir (61, 62).

4.2 APOE İZOFORMLARININ LİPİD SEVİYELERİNE OLAN ETKİSİ

ApoE'nin plazma lipidleri üzerindeki rolünü esas alan toplum çalışmaları, izoformlara özgü önemli etkileri ortaya çıkarmıştır. Bu alışmalar, apoE3'n serum lipid seviyelerindeki değişkenliklere çok az katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık apoE2 ve apoE4'n serum lipid ve lipoprotein seviyeleri üzerinde önemli etkileri vardır. ApoE2; serumda artmış trigliserid ve apoE seviyeleri ile azalmış apolipoprotein B (apoB) ve kolesterol seviyeleri, apoE4 varlığı ise artmış apoB ve kolesterol düzeyleri, azalmış apoE düzeyleri ile ilişkilidir (şekil 9). ApoE2 ve apoE4'n lipid düzeyleri üzerine olan etkisinin işlevsel değişkenliklerinin sonucu olabileceği bildirilmektedir. ApoE'nin toplumdaki kolesterol seviyelerindeki değişkenliğin %10 kadarından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (63, 64).



Şekil 9: ApoE izoformlarının apoE, apoB, plazma trigliserid, total ve LDL kolesterol seviyeleri üzerindeki etkileri (65).

4.3 APOE4 VE ARTMIŞ KALP HASTALIĞI RİSKİ

Tip III HLP yokluğunda; apoE4 ciddi kalp hastalığı riski oluştururken, en yararlı apoE izoformu apoE2'dir. Normolipidemik toplumda yapılan bir çalışmada apoE4'ün; artmış total ve LDL-kolesterol, artmış apoB ile ilişkisi gösterilmiştir. Artmış kolesterol ile ilgili kabul edilen esas açıklama LDL reseptörünün downregülasyonudur. Artmış total kolesterol ve yüksek LDL-kolesterol seviyeleri ile artmış kalp hastalığı riski arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Bu nedenle, apoE4 polimorfizmine sahip kişiler, apoE3 polimorfizmine sahip kişilerle karşılaştırıldığında daha yüksek kalp hastalığı riski taşımaktadırlar. Aynı çalışmalar apoE2 polimorfizmine sahip kişilerde azalmış kalp hastalığı riskini göstermektedir. Hasta toplumlarda yapılan klinik çalışmalar apoE4'ün hem hiperlipidemik hem de kalp hastalığı olan toplumlarda normalden fazla saptandığını göstermektedir (63, 66-69).

4.4 APOE VE ATEROSKLEROZ

ApoE'nin ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. Bu koruyuculuk apoE izoformuna ve plazma apoE düzeyine bağlıdır. ApoE'nin aterosklerozdaki koruyucu etkisi, normal lipid metabolizmasındaki rolü, özellikle de kalıntı lipoproteinleri dolaşımdan temizlemesi ve ters kolesterol taşınmasındaki rolüne bağlıdır (62, 70).

ApoE yokluğu, artmış risk ile ilişkilidir; ancak çok fazla apoE'ye sahip olmak da artmış riskle ilgili olabilir. Yüksek seviyelerdeki apoE'nin lipolizi inhibe etmedeki veya VLDL üretimini arttırmadaki rolü, artmış ateroskleroz riskini düşündürür, çünkü trigliseridden zengin bu lipoproteinler aterojenik artıkların oluşumuna katkıda bulunabilir. Plazma apoE seviyeleri için maksimum yarar sağlayan optimal bir aralık vardır. Bu aralığın altındaki veya üstündeki değerlerde ateroskleroz için yarardan daha çok risk ortaya çıkmaktadır (28).

4.5 APOE GEN POLİMORFİZMİNİN ALZHEİMER HASTALIĞINDAKİ ROLÜ

Alzheimer hastalığı, kronik nörodejeneratif bir hastalık olup, bireyin organik bir nedene bağlı olarak bilişsel işlevinde giderek artan bozulma şeklinde tanımlanan "bunama"nın en sık rastlanan nedenidir (71).

Alzheimer hastalığı, kortikal ve subkortikal nöronların kaybı ve serebral kortekste belirgin atrofi ile karakterizedir. Mikroskopik düzeydeki temel bulgu senil plaklardır. Bu senil plaklar, nörofibriler yumakları (mikrotübül ile ilişkili protein olan "tau"nun hiperfosforile şeklinden oluşan eşleşmiş sarmal filamentler) içerecek biçimde β -amiloid proteininin oluşturduğu küresel birikimlerdir. Küçük miktarlarda senil plaklar ve nörofibriler yumaklar normal bireylerde de saptanabilirlerse de Alzheimer hastalığında çok fazla miktarlarda bulunurlar. Nörofibriler yumakların çokluğu kognitif bozulma ile kabaca orantılıdır. İlerlemiş Alzheimer hastalığında senil plaklar ve nörofibriler yumaklar çok sayıdadır. (71, 72).

19. kromozom üzerinde yer alan ve apolipoprotein E4'ü kodlayan apoE4 geninin, Alzheimer hastalığı için major risk faktörü olduğu bulunmuştur. Yapılan deneysel araştırmalar, apoE3 ve apoE2'nin mikrotübül ile ilişkili başlıca protein olan tau ile presipitat oluştururken, apoE4 ile oluşturmadığını göstermiştir. ApoE4'ün tau'ya bağlanması, diğer izoformların bağlanmasına oranla çok daha gevşektir. ApoE4 izoformuna sahip bireylerde, tau proteininin diğer tau proteinleri ile eşleşmede serbest kaldığı, bunun da nörofibriler yumakların öncüsü olan eşleşmiş sarmal filamentlerin oluşumuna yol açtığı belirtilmektedir (71-74).

4.6 APOLİPOPROTEİN E'NİN DİĞER ROLLERİ

4.6.1 APOE VE İMMÜN SİSTEM DÜZENLENMESİ

Lipoproteinlerin, antijen ve mitojenler ile indüklenen T lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonunu inhibe etme veya uyarma kabiliyetleri vardır (25). Cuthbert ve Lipsky, LDL reseptörlerine bağlanan az miktardaki lipoproteinlerin, lenfositlerin mitojenlere olan duyarlılığını ve sonuçta lenfosit çoğalmasını güçlendirebileceğini göstermişlerdir (75). Öte yandan, bu lipoproteinler, başka reseptörlere veya hücre yüzeyi bağlanma bölgelerine bağlandıklarında ters bir etkiyle lenfosit aktivitesini inhibe edebilmektedirler. ApoE aynı zamanda interlökin 2 ve transferrin gibi birçok mitojenden gelen sinyallerle de etkileşime girmektedir (76, 77). ApoE'nin biyolojik olarak aktif interlökin 2 üretimini %50-60 oranında azaltarak, hem CD4 hem de CD8 lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği öne sürülmüştür. Azalmış aktivite, interlökin 2 bağımlı lenfosit aktivasyonunu inhibe etmektedir. ApoE'nin mRNA seviyelerini veya salgılanan protein miktarını değiştirmeden interlökin 2 aktivitesini nasıl değiştirdiği bilinmemektedir (77).

4.6.2 APOE VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI

ApoE'nin virüsler, bakteriler ve protozoan parazitler gibi enfeksiyon ajanlarına karşı direnç gelişiminde de rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (78, 79). ApoE'nin sıtmaya karşı koruyucu bir rolü olduğu belirtilmektedir (80).

4.6.3 APOE'NİN DİĞER OLASI ROLLERİ

ApoE'nin hücre içi sinyalizasyon mekanizmalarında da etkisi olduğu düşünülmektedir. ApoE'nin mitojenle indüklenen lenfosit proliferasyonunu baskılayabilme yeteneği muhtemelen hücre içi sinyal sistemleri ile ilişkilidir (76). ApoE'nin mitojenle indüklenen düz kas proliferasyonunu da sinyal iletimini baskılayarak engellediği düşünülmektedir (81). Düz kas hücrelerinin apoE'yi eksprese ettikleri gösterilmiştir (82). ApoE düz kas hücrelerinde sinyal iletimini baskılayarak hücre döngüsünü engellemektedir. ApoE'nin farklı sitostatik işlevlerinin apoE ile etkileşen reseptörlerin çeşitliliğinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (83-85). ApoE'yi hücre içi düzenleyici olaylarla ilişkilendiren diğer bir bulgu ise, ApoE'nin izoformlara özgü bir şekilde hücre içinde birikmesidir. ApoE4 hücre içinde apoE3'den daha az birikir, bu da her bir izoform için farklı hücre içi yollar olduğunu düşündürmektedir (86).

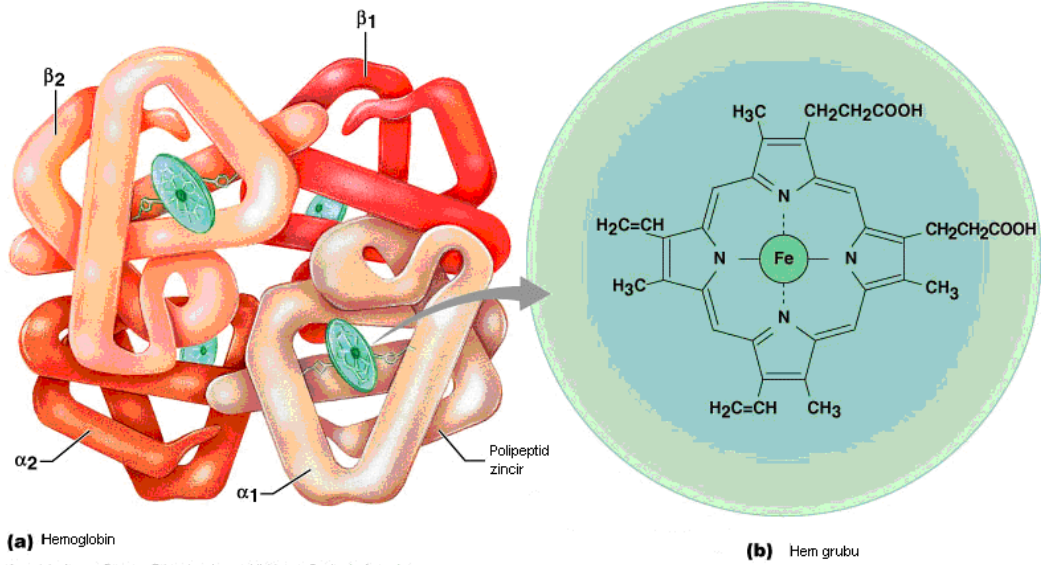
5. TALASEMİLER

“Thalasemia” sözcüğü, eski Yunancadan köken almaktadır (thalas= deniz, emia=anemi) (87). Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize olan ve otozomal resesif geçiş gösteren herediter bir hastalıktır (2).

Talasemiler; kusurlu sentezlenen hemoglobin polipeptid zincirine göre alfa (α), beta (β), delta beta ($\delta\beta$), delta (δ), gama delta beta ($\gamma\delta\beta$) talasemiler olarak sınıflandırılmaktadırlar (1). Normal erişkin hemoglobininin %96 kadarının HbA ($\alpha_2\beta_2$) olması nedeniyle klinik önemi olan talasemiler alfa ve beta zinciri ile ilgili olan talasemilerdir (2).

5.1. HEMOGLOBİNİN YAPISI

Hemoglobin (Hb), 64400 dalton ağırlığında hem ve globinden oluşan bir moleküldür. Hem grubu ile globin zincirleri, birbirlerine kovalen bağlarla bağlanır. Hem; dört pirok halkası ve bir Fe atomun birleşmesinden, globin ise, iki farklı globin çiftinin biraraya gelmesinden oluşur. İnsan hemoglobinlerinin herbiri, bir çift "alfa-benzeri" ve bir çift "beta-benzeri" globin polipeptidinden oluşan bir tetramerdir (1, 24)(Şekil 10).



Şekil 10: Hemoglobinin yapısı.

Sağlıklı bir erişkinde HbA %96, HbA2 %2.5-3.5 ve HbF %1'den az bulunur. Erişkinlerin majör Hb'ni, HbA'dır ($\alpha_2\beta_2$). HbA2'nin yapısında 2 α ve 2 δ zinciri, HbF' in yapısında 2 α ve 2 γ zinciri bulunmaktadır (88).

5.2. DAĞILIM ve SIKLIK

Alfa talasemiler özellikle Çin, Malezya, Güneydoğu Asya ve Afrika'da sık görülürken, beta talasemiler Akdeniz ve Afrika kökenli toplumlarda sık görülür (3). β -Talasemiler, otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en sık görülenidir (2). Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünde (150 milyon) β -Talasemi taşıyıcılığı (Talasemi minör) geni bulunmaktadır (1). Ülkemizde bu konuda yapılmış pek çok çalışma vardır. Buna göre β -Talasemi taşıyıcılık insidansı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte, %0.8-10.8 arasında yöresel farklılık bildirilmektedir (89). Denizli yöresindeki beta-talasemi dağılımı, çeşitli araştırmacıların verdikleri sonuçlara göre %2.6-3.7 arasındadır (90).

5.3. BETA TALASEMİLER

Beta talasemiler, mRNA ve globulin sentezinin azalmasına neden olan mutasyonlar sonucunda meydana gelir (1, 2, 90).

5.3.1. TALASEMİ MİNİMA

Beta talasemilerin en hafif şeklidir. Aile çalışmaları dışında saptanamaz. Ortalama eritrosit hacmi (OEV) ve ortalama eritrosit hemoglobin (OEHb) değerleri normal veya hafif azalmıştır. Tek anormallik, beta zincir sentezinin azalmasıdır (1).

5.3.2. HETEROZİGOT BETA TALASEMİ (BETA TALASEMİ MİNÖR)

İki β geninden yalnızca birisi beta talasemi geni taşımaktadır. Eritrosit morfolojisinde belirgin anormallikler olan fakat genellikle normal veya hafif anemi ile seyreden asemptomatik bir hastalıktır. Tesadüfen veya derin anemisi olan bir hastanın ailesinin araştırılması sonucunda saptanır. Bu hastaların yaşam süreleri normaldir (2).

Laboratuvar bulguları: periferik kan yaymasında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, hedef hücre, bazofilik noktalanma olabilir. Hemogloblin düzeyi genellikle 9-11 g/dl, MCV 50-70 fL arasındadır. Eritrosit sayımında artış ($>5.000.000/mm^3$) gözlenir. Hemogloblin elektroforezinde, erişkin minör hemogloblini olan HbA2 artmıştır ve genellikle % 3.5-7 arasında değişmektedir (1).

5.3.3. TALASEMİ İNTERMEDİA

Şiddetli talasemi major ile talasemi minör arasında çok çeşitli genotipik yapıda olabilen bir anemi tipidir. Bu hastalarda görülen kronik anemi, genellikle araya giren enfeksiyonlar dışında kan transfüzyonu gerektirmez. Nadiren gereken transfüzyonlara ilave olarak artan gastrointestinal demir emilimi hemokromatozise neden olabilir ve buna bağlı komplikasyonlar oluşabilir (2).

Laboratuvar bulguları: bu hastalarda hemogloblin düzeyi genellikle 7 g/dl'nin üzerindedir. Periferik kan bulguları ve eritrosit indeksleri β -talasemi majorda olduğu gibidir (1,2).

5.3.4. HOMOZİGOT BETA TALASEMİ (β -TALASEMİ MAJOR)

Akdeniz anemisi veya Cooley anemisi olarak da bilinir. İlk defa 1925 yılında Thomas Cooley tarafından tanımlanmıştır (2). Klinik olarak beta-talasemilerin en şiddetli formudur. Yenidoğan infant, klinik olarak normal

görünümdeydir. Yenidoğan döneminden itibaren gama globin zincir sentezinin azalması, beta globin sentezinin azlığı ya da tamamen yokluğu ve defektif eritrosit üretimi nedeniyle gelişen etkin olmayan eritropoez ve hemoliz sonucunda hayatın ilk yılında ilerleyici ve şiddetli hemolitik anemi gelişir. Aşırı miktarda alfa zincir birikimi söz konusudur. Doğumdan sonraki 6-12 ay içinde solukluk, irritabilite, anoreksi, ateş ve abdomende genişleme görülür. Hastalarda kısa boy, göreceli olarak büyük bir baş ve karın şişliği gelişir. Maksiller hiperplazi, burun kökü çöküklüğü ve üst dişlerin öne fırlaması gibi kraniyofasiyal değişiklikler talasemik yüzü oluşturur. Hastalarda hafif bir sarılık ile birlikte karaciğer, dalak ve kalp büyüklüğü bulunabilir. Hastalar düzenli olarak 20-30 günde bir ömür boyu kan transfüzyonuna ihtiyaç gösterirler. Tedavi edilmeyen hastalar ilk 5 yıl içinde şiddetli anemi ve enfeksiyon nedeni ile kaybedilirler (88).

Laboratuvar bulguları: periferik kan yaymasında normoblastlar ve eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi, bazofilik noktalanma, hedef hücre, parçalanma vardır. İlk transfüzyondan önce hemoglobin düzeyi 2.5-6.5 g/dl arasında değişebilir. Hipokrom ve mikrositer bir anemi söz konusudur (OEHb < 27 pg, OEH < 80 fL). Retikülosit sayısı genellikle %5-15 arasındadır. Hastalarda trombosit sayısı normal bulunurken, lökositöz gözlenir. Artmış indirekt bilirubin ve hemoliz görülebilir (2). İdrarda ürobilinojen artmıştır. Bazı aminoasitlerin (sistin, histidin, tirozin, lizin, serin, valin) idrarla atılımı artmıştır (91). Serum demiri ve transferrine bağlanmayan demir kısmı artmıştır. Hb elektroforezinde; HbA₂ ve HbF bulunmaktadır, HbA ise azalmıştır (β^+ tip) veya hiç yoktur (β^0 tip) (1, 2).

5.4. BETA TALASEMİ MAJOR' DA TEDAVİ

5.4.1. HİPERTRANSFÜZYON TEDAVİSİ

Günümüzde, talasemi major tedavisinde çoğunlukla hipertransfüzyon tedavi rejimi uygulanmaktadır (1, 92-94). Talasemi major tanısı konulan hastaların hemoglobin düzeyi 7 g/dl altına düştüğünde transfüzyon uygulanmaya başlanır. Pretransfüzyonel hemoglobin 9.5-10 g/dl üzerinde olacak şekilde, 3-4 hafta aralıklarla transfüzyon yapılır (1, 93, 94).

Hipertransfüzyon tedavisinde amaç, yeterli kan transfüzyonu ile etkin olmayan eritropoez sonucu gelişen aşırı intramedüller ve ekstramedüller hematopoezi baskılamak ve doku hipoksisini engelleyecek yeterli oksijenizasyonu sağlamaktır (93, 94). Hipertransfüzyon tedavisinin en önemli komplikasyonu hemokromatozistir (93).

5.4.2. DEMİR ŞELASYONU

Talasemi major olan hastalarda kan transfüzyonlarına ilave olarak intestinal demir emiliminin de fazla olması demir birikimini daha da artırmaktadır. Talasemi majorda morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni hemokromatozistir. Bunun önlenmesi ve tedavisi için demir şelasyonu uygulanmaktadır (93).

5.4.3. VİTAMİN DESTEĞİ

Askorbik asit, desferrioksaminle birlikte kullanıldığında şelate olabilecek demir havuzunu genişletir. E vitamininin etkisi tam gösterilememekle birlikte antioksidan olması nedeniyle eritrositlerin yaşam süresini artırır. Kemik iliğinin hiperaktivitesi nedeniyle görece folik asit eksikliği ve demirle birlikte çinko şelasyonu olduğu için çinko eksikliği sık görüldüğünden hastalara folat ve çinko desteği önerilmektedir (1, 94).

5.4.4. SPLENEKTOMİ

Hipersplenizm bulguları geliştiğinde yapılan splenektomi transfüzyon ihtiyacını ve dolayısıyla hemokromatozisi azaltmaktadır (93).

5.4.5. KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU

Talasemide kemik iliği transplantasyonu halen tek küratif tedavi olarak uygulanmaktadır (1).

6. DEMİR METABOLİZMASI

Demir vücutta tüm hücreler için esansiyel bir elementtir. Normal erişkin bir insanda toplam vücut demiri 4 g civarındadır (erkeklerde 50-55 mg/kg, kadında 35-40 mg/kg). Bunun % 60-65'i hemoglobinde, %10'u miyoglobinde, %5'i hem içeren enzimler, mitokondriyal enzimler ve demire bağlı enzimlerde (prolil ve lizil hidroksilaz, ribonükleotid redüktaz) bulunur. Kalan %20-25'i ferritin veya hemosiderin şeklinde depolanır. Az miktarda demir plazmada transferrine bağlı olarak dolaşır (Tablo III) (95).

Tablo III: Normal bir erişkinde demirin organizmadaki dağılımı (2)

	Demir (mg)	Demir (%)
Hemoglobin demiri	2000 mg	%67
Depo demiri	1000 mg	%27
Miyoglobin	130 mg	%3.5
Değişken havuz	80 mg	%2.2
Dokulardaki demir	8mg	%0.2
Transport demiri	3mg	%0.08

Ferrik demir (Fe^{+3}) halinde diyetle alınan ve mide pH'sı ve C vitamini ile ferröz (Fe^{+2}) hale dönüştürülen demirin, %10'u (~1 mg/gün) jejunumun üst kısımları ve duodenumda emilir (2).

Ferritin ve hemosiderin olmak üzere iki tip depo demiri vardır. Erişkin erkeklerde depo demiri 1000 mg civarında iken, bu değer kadınlarda daha düşüktür (0-500 mg). Depo demirin önemli bir kısmını oluşturan ferritin, suda çözünebilen bir protein olup "Apo ferritin" adı verilen protein bir kılıf ve bunun içerisinde Fe^{+3} depolanan kristaloid bir boşluktan ibarettir. Her bir ferritin molekülü, ortalama 4000 demir molekülü bulundurabilir. Kristaloid boşluk, 6 adet kanal ile dış ortam ile bağlantılıdır, bu sayede ferritin hücre içerisinde bir tampon gibi davranabilir. Sitozoldeki fazla demir okside olarak bu kanallardan içeri girer ve depolanır. Hücre içerisinde demire ihtiyaç olduğu zaman, depolanan bu demir indirgenerek sitozole geçer. 24 alt ünitelerden oluşan Ferritin'in H ferritin ve L ferritin olmak üzere iki tipi vardır. H ferritin; kalp ve eritrositlerde, L ferritin ise; karaciğer, dalak ve plasentada daha yüksek oranda bulunur. Serumda az miktarda bulunan ferritin, hemen tamamıyla L ferritin alt ünitelerinden oluşmaktadır. Bu iki farklı ferritin tipi iki farklı kromozomda kodlanmaktadır (2, 88, 92).

Hemosiderin ise suda çözünmeyen, demir/protein oranı ferritinden çok daha yüksek olan karmaşık yapılı bir ferritin agregatıdır. Işık mikroskopu ile granüller halinde görülebilir. Hemosiderinin yapısındaki demirin dönüşümü oldukça yavaştır (2).

Normal şartlar altında depo demirinin 2/3'ü ferritin, 1/3'ü ise hemosiderin halinde bulunur. Depo demirinin artması halinde, hemosiderinin oranı artar (1, 88).

Transferrin, molekül ağırlığı 79500 dalton olan karaciğerde yapılan, β -globulin fraksiyonunda bir glikoproteindir. Organizmada demir taşınmasında görevlidir. Transferrin toplam vücut demirinin 3 mg gibi çok düşük bir kısmını yapısında bulundurmakla beraber, demir metabolizmasında çok önemli bir role sahiptir. Her bir transferrin molekülü iki ferrik demir atomu bağlayabilir. Plazmadaki transferrinin

bağlayabileceği azami demir miktarına "total demir bağlama kapasitesi" adı verilir (300-360 µg/dl). Normal şartlar altında mevcut transferrinin bağlanma noktalarının 1/3'ü bağlıdır, bu parametre "transferrin doygunluğu" olarak bilinir ve normal değeri %33 civarındadır. Plazma demirinin hemen tamamı transferrinin yüksek demir bağlama ilgisi nedeni ile, transferrine bağlıdır (2).

Transferrine bağlı olarak kemik iliğine ulaşan demir, eritrosit prekürsörleri üzerinde bulunan transferrin 1 (Tfr1) reseptörlerine bağlanır. İki ferrik demir atomu bağlayan transferrin molekülü ve reseptör kompleksi, reseptör aracılıklı endositoz yolu ile sitozole geçer. Fe⁺³, transferrinden ayrılarak Fe⁺² ye indirgenir ve mitokondriye geçer. Mitokondride, Fe⁺² ve protoporfirin IX'dan ferroşelataz enziminin etkisiyle hem sentezi gerçekleşir. Sitozole geçen hem, hemoglobine dönüşür ve yeterli hemoglobine sahip olan hücre, çekirdeğini atarak dolaşıma geçer (2, 92).

Demir dengesi normalde demir emilimi ile düzenlenir. Demir depoları ve demir emilimi arasında ters orantı vardır. Depo demiri azalınca demir emilimi artar, demir birikiminin arttığı durumlarda ise emilim azalır (1, 2).

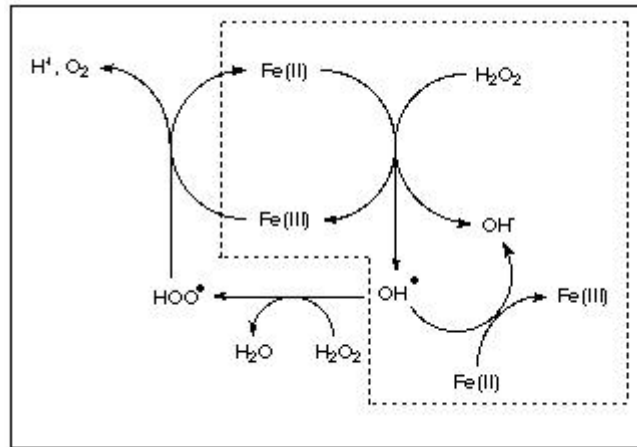
Mukoza hücrelerindeki reseptörler aracılığı ile hücre içerisine giren demir, vücudun demir ihtiyacına göre transferrine bağlanarak portal dolaşıma katılır yada ince bağırsak hücrelerinde ferritin olarak kalır ve bu hücrelerin ömrünü tamamlaması ile onlarla birlikte dökülür. Normal şartlar altında bu şekilde feçes, idrar, ter, saç ve tırnaklar yoluyla organizmadan kayıp edilen günlük demir miktarı 1 mg civarındadır (88, 92).

7. HEMOKROMATOZİS

Hemokromatozis, hücresel düzeyde patolojik değişikliklere neden olan demir birikimidir. Çok sayıda transfüzyon gerektiren hastalıklarda sekonder hemokromatozis gelişir. Talasemi majorda hem düzenli transfüzyonlar hem de gastrointestinal demir emiliminin artışı, hastalığın en önemli komplikasyonu olan hemokromatozise neden olur (93).

Demir; başlıca dalakta retiküloendotelyal makrofajlar, kemik iliği, karaciğer, endokrin bezler ve miyokard olmak üzere hemen hemen tüm dokularda birikir ve parankimal hücrelerde ilerleyici toksisite geliştirir (95-97). Talasemi major olan hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni serbest demir birikimidir (93).

Yüksek doz demirin zararlı etkileri, öncelikle oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak ürün olmasıyla ilgili olabilir (98). Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yolu ile (Şekil 11), plazmada bivalent veya trivalent transferine bağlı olmayan demir, hidroksil (OH^*) radikallerinin oluşumu ile oldukça toksik bir etki oluşturur (4). Bu da zar lipidleri ve proteinlerinin peroksidatif hasarına neden olur. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik oksidatif stres ve hastalıklar ile sonuçlanır (99).



Şekil 11: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları (100).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. GEREÇ

1.1. ÇALIŞMA GRUBU

Nisan 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Denizli Devlet Hastanesinde tedavi görmekte olan 7-25 yaş arası 23 erkek, 17 kız, toplam 40 talasemi major hastası çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu, talasemi major hasta grubu ile yaş ve cinsiyet olarak benzer, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik değerlendirme sonucunda herhangi bir kardiyovasküler hastalığı ve bilinen bir hastalığı olmayan 40 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulunun onayı ve çalışmaya katılan kişilerden ve/veya velilerinden yazılı izin alındı.

Hastaların ekokardiyografik değerlendirmesi; Kardiyoloji Anabilim Dalında hastaların klinik durumlarından habersiz olan aynı gözlemci tarafından, ekokardiyografi cihazı (Contron-Sigma, 2.5- 5 MHz transduser) kullanılarak yapıldı. Çalışmaya katılan bireylerin sol ventrikül fonksiyonları, Amerikan Ekokardiyografi Derneği (ASE) kriterlerine (101-103) göre değerlendirildi.

Çalışmaya katılan bireylerden apoE genotiplendirmesi için EDTA'lı tüplere 5 ml kan alındı. Alınan kanlar, DNA izolasyonu yapılana kadar -20 °C'de saklandı. Ferritin düzeyleri ölçümleri için antikoagülan içermeyen tüplere kan alındı. Alınan kanlar pıhtılaşması için 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve hemen ferritin düzeyleri ölçüldü.

1.2. KULLANILAN ENSTRUMANLAR

- Vorteks/Spin santrifüj (FVL-2400N, Biosan, Letonya)
- Kuru ısıtıcı blok (TDB120, Biosan, Letonya)
- Soğutmalı masa üstü santrifüjü (MİKRO 22 R, ABD)
- U.V spektrofotometre (UV-1601, Shimadzu, Japonya)
- pH metre (pH 526, WTW, Almanya)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Yatay ve dikey elektroforez seti (Model 1214-Model 710-Model 73.10.10, CLP, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Power Station 300, Labnet, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (EC1000-90, Thermo, ABD)
- Thermal cyclers (ATC 201, CLP, ABD)
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye)
- -20 C⁰ Derin dondurucu (Beko, Türkiye)
- +4 C⁰ Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Analitik Teraziler (sartorius, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 200, ABD)
- Ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10 µL, 10-100 µL, 10-1000 µL) (CLP, ABD)
- Immulite One immünölçüm cihazı (DPC, ABD)

1.3. KULLANILAN SARF MALZEMELER:

- 10 µL, 100 µL, 1000 µL Filtreli otomatik pipet uçları (CLP, ABD)
- 0.2 ml PCR tüpleri (CLP, ABD)
- 0,5 ml nükleaz içermeyen tüpler (CLP, ABD)
- 1,5 ml nükleaz içermeyen tüpler (CLP, ABD)

1.4. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER:

- Amonyum klorür (Scharlau, Almanya)
- Amonyum peroksidisülfat (Scharlau, Almanya)
- Agaroz (Scharlau, Almanya)
- N, N'-Metilen-bis-akrilamid (Scharlau, Almanya)
- Borik asit (Scharlau, Almanya)
- Etilen diamin tetra asetik asit (Scharlau, Almanya)
- Etidyum bromid (Scharlau, Almanya)
- Etanol (Scharlau, Almanya)
- Orange G, jel yükleme boyası
- Potasyum bikarbonat (Scharlau, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Scharlau, Almanya)
- Potasyum Klorür (Scharlau, Almanya)
- Sodyum Klorür (Scharlau, Almanya)
- Sodyum asetat (Scharlau, Almanya)
- Tris-HCl (Scharlau, Almanya)
- Tris-hidroksimetil-aminometan (Scharlau, Almanya)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin) (Scharlau, Almanya)
- Proteinaz K (Roche, Almanya)
- Primerler (Metabion International AG, Almanya)
Sens: 5'-TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA-3'
Antisens: 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'
- dNTP karışım (Metis, Türkiye)
- Dimetil sülfoksid (Scharlau, Almanya)
- Taq polimeraz (Metis, Türkiye)
- 100 bp marker (Fermantas, Litvanya)
- pBR322 DNA/ BsuRI Marker (Fermantas, Litvanya)
- HhaI (CfoI) Restriksiyon enzimi (Fermantas, Litvanya)
- Restriksiyon tamponu (Fermantas, Litvanya)

1.5. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1.5.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

- Eritrosit lizis tamponu: 20 mM Tris-Cl (pH: 7.6). Otoklavda sterilize edildi. +25 C⁰'de saklandı.
- Hücre lizis tamponu: 10 mM Tris-Cl (pH: 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), %0.1 SDS (w/v). Otoklavda sterilize edildi. +4 C⁰ de saklandı.
- PBS (phosphate buffered saline) : pH: 7.4. Otoklavda sterilize edildi. +4 C⁰ de saklandı.
- Sodyum asetat tamponu: 3 M Na-asetat, 5 M Glasiyel asetik asit. Otoklavda sterilize edildi. +4 C⁰ de saklandı.
- TE (Tris-EDTA) tampon: 100 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM EDTA(pH 8.0). Otoklavda sterilize edildi. +25 C⁰ de saklandı.

1.5.2. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler:

- 5xTBE : 54 gr tris-baz, 27.5 gr borik asit tartıldı. Üzerine 20 ml 0.5 M pH: 8.0 EDTA eklendi. Karışımın son hacmi 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 0,5 M EDTA (pH:8.0) : Sodyum hidroksit ile pH: 8.0'e ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi.

1.5.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler:

- %10 Amonyum Persülfat : 1 hafta stabildir.

2. YÖNTEMLER

2.1. FERRİTİN ANALİZİ

Ferritin analizi, kemilüminesans yöntem ile Immulite One immünölçüm analizöründe (DPC, Amerika) yapıldı. Ferritinin erişkinlerdeki referans aralıkları kit prospektüsünde; erkeklerde: 28–397 ng/ml, kadınlarda: 6–159 ng/ml olarak verilmiştir.

2.2. KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA'NIN İZOLE EDİLMESİ

DNA izolasyonu, “memeli DNA'larının hızlı izolasyonu” yöntemi (104) modifiye edilerek yapıldı. Çalışmamızda önce nükleus içermeyen eritrositler, eritrosit lizis solüsyonu ile hipotonik ortamda parçalanıp uzaklaştırıldı. Daha sonra lökositler, hücre lizis solüsyonu ile parçalandı. DNA haricindeki hücre içeriği, doymuş tuz çözeltisinde çöktürülerek ayrıştırıldı. DNA, etanol çöktürmesi ile tuzlardan arındırıldı ve konsantre edildi. Periferik kandan DNA'nın izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı:

- 1- İki tane 1.5 ml'lik eppendorf tüpe 900 µl eritrosit lizis tamponu koyuldu.
- 2- Her bir tüpe 300 µl tam kan eklendi. Tüpler 25 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra, 25 °C 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası süpernatant kısımlar döküldü. Her iki tüpteki pelletler birleştirildi.
- 4- Pelletin üzerine 1 ml PBS koyuldu. 4 °C 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.
- 5- Kalan pellet üzerine 1 ml PBS koyuldu, 4 °C 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.
- 6- Kalan pelletin üzerine 600 µl hücre lizis tamponu eklendi.
- 7- 3 µl proteinaz K eklendi, 55 °C'de 3 saat inkübe edildi. Örneğin oda sıcaklığına gelmesini beklendikten sonra, 200 µl Na-asetat çözeltisi eklendi. Tüp şiddetli vortekslendi. Ardından 4 °C 14.000 rpm'de santrifüj edildi.

8- Süpernatant kısmı ~ 400'er µl olacak şekilde iki yeni tüpe aktarıldı. Tüplere 1100'er µl absolut (%100) etanol eklendi, 25 °C 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.

9- Kalan pelletin üzerine 1000 µl % 70 etanol eklendi, 25 °C 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.

10- Yaklaşık 30 dakika tüplerdeki pelletin kurumması beklendi.

11- Kuruyan pellet üzerine 15 µl 1xTE tamponu eklendi. Pellet oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilerek çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

2.2.1. DNA SAFLIK TAYİNİ

DNA örnekleri distile su ile 1/200 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans, spektrofotometre distile su ile kör ayarı yapıldıktan sonra ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. Oranı 1.7-1.8 olan DNA'lar saf olarak kabul edildi (104).

2.2.2. DNA DÜZEYLERİNİN HESAPLANMASI

DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 birimlik absorbans 50 µg/ml'dir (104). Bu bilgiden yararlanılarak DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

DNA konsantrasyonu (µg/ml): Sulandırma katsayısı (200) x A_{260} x 50

2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ

DNA örneklerinden, apoE kodlayıcı genin polimorfik bölgesini içeren 227 bazlık bölgenin çoğaltılması, Hixson ve Vernier yöntemi (105) modifiye edilerek yapıldı. Amplifikasyon için, 47,5 µL hacminde PCR karışımı hazırlandı (Tablo IV).

Tablo IV: PCR karışımı hazırlanması.

	1 reaksiyon (µL)
Distile Su	32.3
10 x PCR tampon	5
dNTP Karışım	1
Primer Sense (F)	0.5
Primer Antisense (R)	0.5
MgCl ₂	5
DMSO (Dimetil sülfoksit)	3
Taq Polimeraz	0.2
Toplam Hacim	47.5

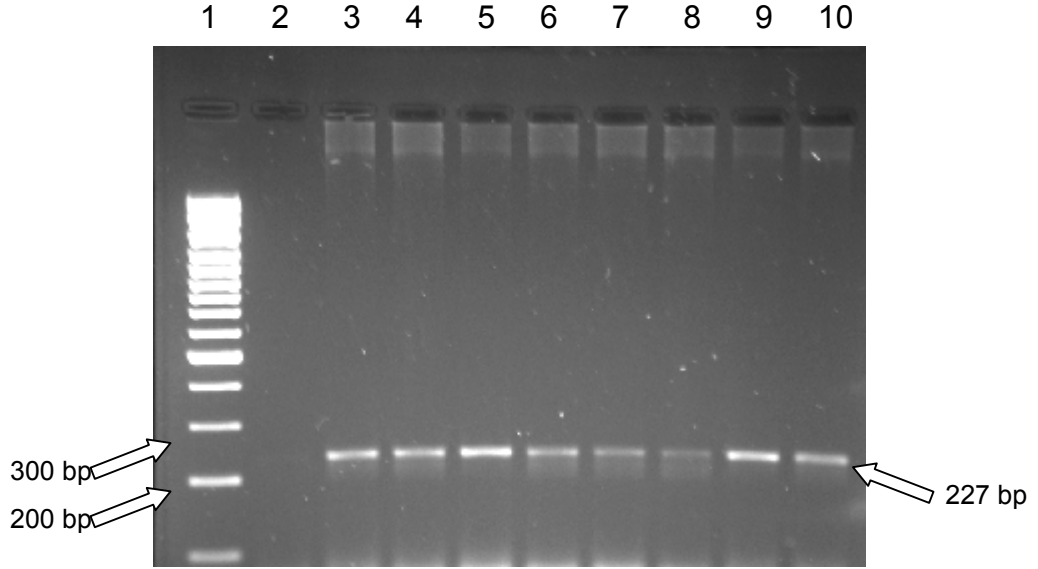
PCR karışımı hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lik PCR tüplerine 47.5 µL PCR karışımı eklendi. Negatif kontrol tüpüne 2.5 µL distile su, örnek tüplerine 2.5 µL DNA örneği eklendi. PCR tüpleri hemen Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Tüplerin her biri çift zincirin birbirinden ayrılması ve aktivasyon için 94 °C'de 5 dakika ısıtıldı. Her bir döngüsü 94 °C'de 30 saniye (çift zincirin birbirinden ayrılması), 70 °C'de 1 dakika 30 saniye (primer bağlanması) olan 30 çoğaltma döngüsü uygulandı. Son döngüden sonra 72 °C'de 5 dakikalık ilave bir uzama inkübasyonu uygulandı (Tablo V).

Tablo V: ApoE çoğaltma programı

Aşama	Döngü	Kademe	Sıcaklık	Zaman (dakika:saniye)
1	1	1	94	5:00
2	30	1	94	0:30
		2	70	1:30
3	1	1	72	5:00

2.3.1. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

PCR sonrası çoğaltılmış ürünlerin incelenmesi için etidyum bromid eklenmiş %2'lik agaroz jel hazırlandı. PCR ürünü Orange G jel yükleme tamponu ile karıştırıldı. Karışım kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 100 bp marker, yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra yüklendi. Örnekler 150 Volt'da ~45 dakika yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme sistemi ile PCR sonrası çoğaltılmış ürünlerde, apoE kodlayıcı genin polimorfik bölgesini içeren 227 bazlık bölge incelendi (Şekil 12).

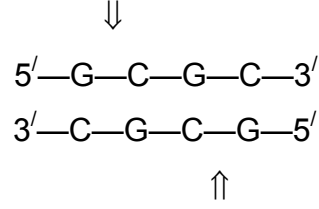


Şekil 12: PCR sonrası 227 baz çiftlik çoğaltılmış ürünler. Soldan sağa; 100 bp marker, negatif kontrol, hasta örnekleri (3-10 numaralı kuyucuklar).

2.4. RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ (RFLP) ANALİZİ

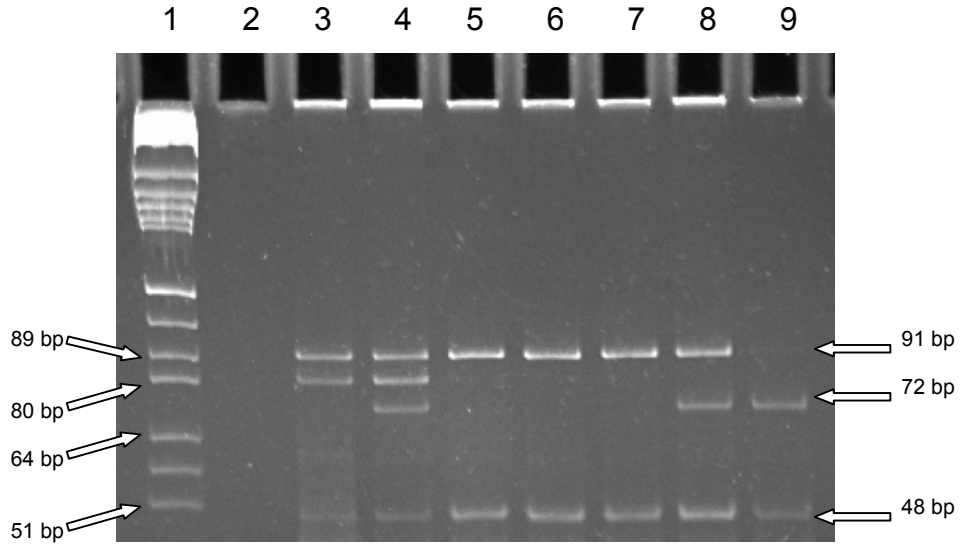
Hedef DNA'nın çoğaltılması ile elde edilmiş olan apoE kodlayıcı genin polimorfik bölgesini içeren 227 bazlık kısımda, modifiye Hixson ve Vernier yöntemi (105) ile restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizi gerçekleştirildi. Kesim işleminde bir örnek için 15 µl PCR amplifikasyon ürünü, 1.6 µl 10x tampon, 0.4 µl HhaI (10 u/µl) kesim enzimi kullanıldı. Ardından örnekler 37 °C'de inkübe edildi. HhaI (CfoI) kesim

enzimi *Haemophilis haemolyticus* bakterisinden izole edilerek hazırlanmıştır. Bu enzimin DNA molekülü üzerindeki kesim bölgesi aşağıda gösterilmiştir:



2.4.1. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)

Kesim sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için %12'lik jel hazırlandı. Jel iyice polimerize olduktan sonra ortama 1xTBE tampon eklendi. pBR322 DNA/BsuRI marker, negatif kontrol ve kesim örnekleri kuyucuklara yüklendi. Elektroforez 175 Volt'da 90 dakika süre ile gerçekleştirildi. Elektroforez sona erdikten sonra jel, etidyum bromid ile boyandı. Daha sonra jel görüntüleme sistemi ile restriksiyon sonrası elde edilen bantlar incelendi (Şekil 13).



Şekil 13: %12'lik poliakrilamid jelde HhaI kesim ürünleri. Soldan sağa; 1- pBR322 DNA/BsuRI marker, 2- Negatif kontrol, 3- E2/3, 4- E2/4, 5-6-7- E3/3, 8- E3/4, 9- E4/4.

3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 11.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanıldı. Ölçümle belirtilen değişkenler, ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde, bağımsız örneklem t-testi (Independent-samples t-test), Mann-Whitney U testi, Ki-kare analiz yöntemi (Fischer'in kesin Ki-kare testi, Pearson Ki-kare testi) kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 23 erkek, 17 kız toplam 40 Talasemi major hastası alındı. Talasemi major grubunda ortalama yaş 13.1 ± 4.5 yıl idi. Kontrol grubu ise, 23 erkek, 17 kız toplam 40 hastadan oluşturuldu ve yaş ortalaması 13.6 ± 4.3 yıl idi. Talasemi major grubu ile kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet olarak fark yoktu. Talasemi major grubunun boy ve ağırlıkları kontrol grubuna göre düşük bulundu (Tablo VI).

Tablo VI: Talasemi major ve kontrol gruplarının yaş, boy ve ağırlıklarının karşılaştırılması*

Değişken	Talasemi major ($\bar{X} \pm SD$)	Kontrol ($\bar{X} \pm SD$)	p değeri	
Yaş (yıl)	13.1 ± 4.5	13.6 ± 4.3	0.66	AD
Boy (cm)	137.1 ± 16.2	154.6 ± 18.3	0.0001	A
Ağırlık (kg)	35.7 ± 12.3	49.3 ± 18.0	0.0001	A

*: A: Anlamli, AD: Anlamli değil

Talasemi major hastalarında, ortalama ferritin düzeyi 4358 ± 1912 ng/ml, ortalama tanı koyulma yaşı 15.7 ± 19.4 ay, ortalama ilk transfüzyona başlanma yaşı 15.9 ± 19.3 ay idi (Tablo VII). Onsekiz hastaya splenektomi yapılmıştı. Otuzdokuz hasta eritrosit, 1 hasta tam kan transfüzyonu alıyordu.

Tablo VII: Talasemi major grubundaki hastaların hematolojik parametreleri

	($\bar{X} \pm SD$)
Ferritin düzeyi (ng/ml)	4358 ± 1912
Ortalama tanı yaşı (ay)	15.7 ± 19.4
Ortalama ilk transfüzyona başlanma yaşı (ay)	15.9 ± 19.3

Talasemi major ve kontrol gruplarındaki bireylerin apoE genotip dağılımları Tablo VIII'de verildi. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi, talasemi major ve kontrol gruplarında sırasıyla %67.5 ve %75 sıklığında bulundu. $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipine her iki grupta, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine ise kontrol grubunda rastlanmadı. Talasemi major ve kontrol grupları arasındaki genotip sıklıklarının farklılığı, bazı gözlere düşen birey sayısı X^2 testi için yeterlilik sağlayamadığından istatistiksel olarak verilmedi.

Tablo VIII: Talasemi major ve kontrol gruplarında apoE genotip dağılımları

	Talasemi major (n=40) n (%)	Kontrol (n=40) n (%)
$\epsilon 2/\epsilon 2$	-	-
$\epsilon 2/\epsilon 3$	2 (%5)	5 (%12.5)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1 (%2.5)	1 (%2.5)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	27 (%67.5)	30 (%75)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9 (%22.5)	4 (%10)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	1 (%2.5)	-

Talasemi major ve kontrol gruplarında genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ($\epsilon 4$ taşıyıcı) ve içermeyen bireylerin dağılımları Tablo IX'da verildi. Talasemi major ve kontrol grupları arasında, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.161$).

Tablo IX: Talasemi major ve kontrol gruplarında genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıklarının karşılaştırılması*

	Talasemi major (n=40) n (%)	Kontrol (n=40) n (%)
$\epsilon 4$ alleli içerenler ($\epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$)	11 (%27.5)	5 (%12.5)
$\epsilon 4$ alleli içermeyenler ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 3$)	29 (%72.5)	35 (%87.5)

* : Gruplar arası farklılık Ki kare testi ile değerlendirilmiştir ($p=0.161$).

Talasemi major ve kontrol gruplarındaki apoE allel sıklıkları dağılımı Tablo X'da verildi. ApoE allel sıklıklarının hesaplanmasında gen sayma yöntemi kullanıldı. $\epsilon 3$ alleli, talasemi major ve kontrol gruplarında sırasıyla %81.3 ve %86.3 sıklığında bulundu. Kontrol grubunda $\epsilon 2$ alleli (%7.5), talasemi major grubunda $\epsilon 4$ alleli (%15) ikinci sıklıkta bulunan allellerdi. Talasemi major ve kontrol grupları arasındaki allel sıklıklarının farklılığı, bazı gözlere düşen birey sayısı X^2 testi için yeterlilik sağlayamadığından istatistiksel olarak verilmedi.

Tablo X: Talasemi major ve kontrol gruplarında apoE allel sıklıklarının dağılımı

	Talasemi major (allel sayısı=80) allel sayısı (%)	Kontrol (allel sayısı=80) allel sayısı (%)
$\epsilon 2$	3 (%3.8)	6 (%7.5)
$\epsilon 3$	65 (%81.3)	69 (%86.3)
$\epsilon 4$	12 (%15)	5 (%6.3)

Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major bireyleri ile sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan talasemi major ve kontrol gruplarındaki bireylerin, apoE genotip dağılımları Tablo XI'de verildi. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major grubunda, $\epsilon 2$ allelinin bulunduğu $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmadı. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major grubundaki bireylerden bir tanesi $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine sahipti. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplar arasındaki genotip sıklıklarının farklılığı, bazı gözlere düşen birey sayısı X^2 testi için yeterlilik sağlayamadığından istatistiksel olarak verilmedi.

Tablo XI: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major bireyleri ile sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan talasemi major ve kontrol grubu bireyelerinin, apoE genotip sıklıklarının dağılımı

	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olanlar (n=27) n (%)	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayanlar (n=53)* n (%)
$\epsilon 2/\epsilon 2$	-	-
$\epsilon 2/\epsilon 3$	-	7 (%13.2)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	-	2 (%3.8)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	19 (%70.4)	38 (%71.7)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	7 (%25.9)	6 (%11.3)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	1 (%3.7)	-

*: Sol ventrikül disfonksiyonu olmayan 13 talasemi major hastası + Sol ventrikül disfonksiyonu olmayan 40 kontrol bireyi.

Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ile sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan gruplarda, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireyelerin dağılımları Tablo XII'de verildi. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplar arasında, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireyelerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.147).

Tablo XII: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren bireyelerin sıklıklarının karşılaştırılması *

	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olanlar (n=27) n (%)	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayanlar** (n=53) n (%)
$\epsilon 4$ alleli içerenler ($\epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$)	8 (%29.6)	8 (%15.1)
$\epsilon 4$ alleli içermeyenler ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 3$)	19 (%70.4)	45 (%84.9)

* : Gruplar arası farklılık Ki kare testi ile değerlendirilmiştir ($X^2=2.362$, p=0.147).

** : Sol ventrikül disfonksiyonu olmayan 13 talasemi major hastası + Sol ventrikül disfonksiyonu olmayan 40 kontrol bireyi.

Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ile sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan gruplardaki, apoE allel sıklıkları dağılımı Tablo XIII'de verildi. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hasta grubunda, $\epsilon 2$ alleli mevcut değildi. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda $\epsilon 3$ alleli sırasıyla %83.3 ve %84 sıklığında bulundu. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda $\epsilon 4$ alleli sırasıyla %16.7 ve %7.5 sıklığında bulundu. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan gruplar arasında allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p=0.025$). Bu anlamlılığın sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan grupta, $\epsilon 2$ allelinin mevcut olmamasından kaynaklandığı saptandı. $\epsilon 4$ allel sıklığının gruplar arasındaki farklılığının istatistiksel analizi, çalışmadaki birey sayısı yeterlilik sağlayamadığından yapılamadı.

Tablo XIII: Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, apoE allel sıklıklarının karşılaştırılması *

	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olanlar (allel sayısı=54) allel sayısı (%)	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayanlar (allel sayısı=106) allel sayısı (%)
$\epsilon 2$	-	9 (%8.5)
$\epsilon 3$	45 (%83.3)	89 (%84)
$\epsilon 4$	9 (%16.7)	8 (%7.5)

* : Gruplar arası farklılık Ki kare testi ile değerlendirilmiştir ($X^2=7.387$, $p=0.025$).

Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin apoE genotip sıklıklarının dağılımı Tablo XIV'de verildi. Ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük olan talasemi major bireylerinde, $\epsilon 2$ allelinin bulunduğu $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmadı. Gruplar arasındaki genotip sıklıklarının farklılığı, bazı gözlere düşen birey sayısı X^2 testi için yeterlilik sağlayamadığından istatistiksel olarak verilmedi.

Tablo XIV: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin apoE genotip sıklıklarının dağılımı

	Talasemi major (Ferritin < 2500 ng/ml, n=7) n (%)	Talasemi major (Ferritin > 2500 ng/ml, n=33) n (%)
$\epsilon 2/\epsilon 2$	-	
$\epsilon 2/\epsilon 3$	-	2 (%6.1)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	-	1 (%3)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	5 (%71.4)	22 (%66.7)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	2 (%28.6)	7 (%21.2)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	-	1 (%3)

Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıklarının dağılımları Tablo XV'de verildi. Gruplar arasında, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=1.000$).

Tablo XV: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıklarının karşılaştırılması *

	Talasemi major (Ferritin < 2500 ng/ml, n=7) n (%)	Talasemi major (Ferritin > 2500 ng/ml, n=33) n (%)
$\epsilon 4$ alleli içerenler ($\epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$)	2 (%28.6)	9 (%27.3)
$\epsilon 4$ alleli içermeyenler ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 3$)	5 (%71.4)	24 (%72.7)

* : Gruplar arası farklılık Ki kare testi ile değerlendirilmiştir ($p=1.000$).

Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin, apoE allel sıklıkları dağılımı Tablo XVI'da verildi. Ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük olan talasemi major grubunda $\epsilon 2$ alleli mevcut değildi. Gruplar arasındaki allel sıklıklarının farklılığı, bazı gözlere düşen birey sayısı X^2 testi için yeterlilik sağlayamadığından istatistiksel olarak verilmedi.

Tablo XVI: Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan bireylerin, apoE allel sıklıklarının dağılımı

	Talasemi major (Ferritin < 2500 ng/ml, allel sayısı=14) allel sayısı (%)	Talasemi major (Ferritin >2500 ng/ml, allel sayısı=66) allel sayısı (%)
ε2	-	3 (%4.5)
ε3	12 (%85.7)	53 (%80.3)
ε4	2 (%14.3)	10 (%15.2)

Talasemi major olan hastalarda, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan bireylerin, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan bireylere göre ferritin düzey ortalamaları daha yüksek bulundu. Gruplar arasında ferritin düzey ortalamaları karşılaştırıldığında, bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmadı (p=0.648).

Tablo XVII: Talasemi major olan hastalarda, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan bireylerin ferritin düzeylerinin karşılaştırılması *

	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major (n=27) ($\bar{X} \pm SD$)	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan talasemi major (n=13) ($\bar{X} \pm SD$)	p değeri	
Ferritin (ng/ml)	4453 ± 1978	4160 ± 1828	0.648	AD

* AD: Anlamlı değil

Talasemi major grubunda, genotipinde ε4 alleli içeren bireylerin ferritin düzey ortalamaları, genotipinde ε4 alleli içermeyen bireylerin ferritin düzey ortalamalarına göre daha düşük bulundu. Gruplar arasında ferritin düzey ortalamaları karşılaştırıldığında, bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmadı (p=0.715).

Tablo XVIII: Talasemi major olan hastalarda genotipinde ϵ 4 alleli içeren ve içermeyen bireylerin ferritin düzeylerinin karşılaştırılması*

	ϵ 4 alleli içerenler (n=11) ($\bar{X} \pm SD$)	ϵ 4 alleli içermeyenler (n=29) ($\bar{X} \pm SD$)	p değeri	
Ferritin (ng/ml)	4199 \pm 1494	4418 \pm 2070	0.715	AD

* AD: Anlamlı değil

TARTIŞMA

β -Talasemiler, otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en sık görülenidir (2). Denizli yöresindeki beta-talasemi dağılımları, çeşitli araştırmacıların verdikleri sonuçlara göre %2.6 ile %3.7 arasında değişmektedir (90).

Hastalığın klasik tedavisi periyodik yapılan kan transfzyonlarıdır. Yapılan transfüzyonlar ve artmış gastrointestinal demir absorpsiyonu nedeni ile, bu hastalarda sekonder hemokromatozis gelişmektedir. Demir; dalak, kemik iliği, karaciğer, endokrin bezler, kalp gibi hemen hemen tüm organlarda birikmekte ve bu organlarda ilerleyici toksisite oluşmaktadır (1, 88, 92).

Talasemi major olan hastalarda, sekonder hemokromatozis, kronik anemi, enfeksiyonlar ve genetik faktörler nedeniyle kardiyak komplikasyonlar gelişmekte ve bu hastalarda en sık ölüm nedeni olmaktadır (15, 92, 106). Talasemi major hastalarında erken dönemde diyastolik, geç dönemde sistolik kalp yetmezliği gelişmektedir (107, 108). Talasemi major hastalarında kardiyak disfonksiyon gelişimi, birçok nedene bağlı olmakla birlikte en önemli neden sekonder hemokromatozistir (1).

Talasemi major hastalarında görülen komplikasyonların temelinde hücre hasarlanması olduğu bilinmektedir. Talasemi major hastalarında hücre hasarlanması nedenlerini açıklamaya yönelik çeşitli teoriler ne sürülmektedir. Bu teorilerden birine göre patolojik demir birikimi nedeni ile hücre zarı bileşenleri zarar görmekte ve sonuçta hücre hasarı gelişmektedir. Hepatosit mikrozomları ve mitokondri zarlarının peroksidasyonu, parenteral veya oral demir verilerek patolojik demir birikimi oluşturulan sıçanlarda deneysel olarak gösterilmiştir. Bu durum aynı zamanda talasemili major olan hastalarda da gösterilmiştir (93).

Kalp kasında, hücre zarları ve sarkoplazmik zarlar hücre dışı sıvı ile doğrudan temas halinde bulunurlar. Bu nedenle kalp kası zarlarının demir toksisitesinden etkilenmesi kolaylaşmaktadır (109).

Talasemi major hastalığında; hücre içinde heme bağlı olmayan demir ile plazmada demirin artmış olması ve yapısı bozuk globin zincirleri oksidatif stresin nedenidir (93, 96). Sağlıklı bireylerde dolaşımdaki transferrinin yalnızca %30'u demir bağlıdır. Patolojik demir birikiminde, transferrinin bağlama kapasitesinin üzerinde demir birikimi olur (96). Yüksek doz demirin zararlı etkileri, bu hastalarda demirin reaktif oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak olmasıyla ilgilidir (98). Plazmada transferrine bağlı olmayan demir, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yolu ile hidroksil (OH^{*}) radikallerinin oluşumu sonucu oldukça toksik bir etki oluşturmaktadır (4-8). Bu toksik etki, zar lipidleri ve proteinlerinin peroksidatif hasarına neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik oksidatif stres ve hastalıklar ile sonuçlanmaktadır (99). Kalpte, serbest radikaller ve antioksidan mekanizma arasındaki dengesizlik mitokondri iç zarındaki elektron taşıma zincirinde de bozulmaya neden olmakta bu da klinik olarak ölümcül kardiyomiyopati olarak gözlenen anormal enerji metabolizması ile sonuçlanmaktadır (5, 9, 13).

Transfüzyonlar sonucunda oluşan hemokromatozisi önlemek için yapılan etkin şelasyon tedavileri ile, talasemi major hastalarının yaşam kalitesinde ve sürelerinde belirgin bir iyileşme gözlenmektedir (108). Desferrioksamin ile yapılan düzenli transfüzyonlar, idrar ve dışkı ile demirin atılmasını arttırmakta, sonuçta kardiyak fonksiyon bozukluğu düzelmekte ve yaşam süresi uzamaktadır (58).

Olivieri ve ark., demirle ilişkili kardiyak hastalık ve diğer hemokromatozis komplikasyonlarının oluşmaması için ferritin düzeyinin 2500 ng/ml'nin altında tutulmasını önermektedirler (58). Talasemi majorda kardiyak komplikasyonların en sık nedeni sekonder hemokromatozis

olmakla birlikte dokulardaki gerçek demir düzeyini belirlemek zordur. Cohen ve ark. serum ferritin düzeyinin myokardiyal demir yükünü göstermede yetersiz kaldığını, demir yüklenmesinin ve kardiyak komplikasyonların kalpte biriken demir miktarı ile doğrudan ilişkili olabileceğini belirtmektedirler. Son zamanlarda kardiyak MR ile doku demir düzeyi başarılı bir şekilde belirlenebilmektedir (110).

Çalışmamızda, talasemi major olan hastalardaki ortalama ferritin düzeyleri, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan bireylerde (4453 ± 1978 ng/ml), sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan bireylere (4160 ± 1828 ng/ml) göre daha yüksek bulundu. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Yunan ve İtalyan toplumlarında yapılan çalışmalarda da kardiyak durumlarına göre talasemi major grupları arasında, ortalama ferritin düzeyleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır (14, 15).

Şelasyon tedavilerinden hastaların çoğu yarar görse de, tedaviye rağmen bazı hastalarda organ yetmezliği gelişmekte ve hastalar organ yetmezlikleri nedeniyle ölmektedirler (1, 111).

Buna bağlı olarak, bazı talasemi major hastalarında şelasyon tedavisinin etkin olmadığı veya demir birikimine karşı bu hastaların yeterli antioksidan savunma mekanizmalarının bulunmadığı düşünülebilir. Talasemi major hastalarında en sık ölüm nedeni olan kardiyak komplikasyonların nedenleri arasında, hemokromatozis dışında diğer faktörler de düşünülmelidir.

Talasemi major hastalarında, kardiyak fonksiyon bozukluğu olanlarda daha yüksek ferritin değerlerinin olmaması, sol ventrikül yetmezliği gelişiminde genetik bir risk faktörünün rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir (14, 15).

ApoE'nin kolesterol taşınmasında, metabolizmasında ve Alzheimer hastalığındaki işlevleri bilinmektedir (40). ApoE'nin antioksidan özelliğinin olduğu ve bu özelliğinin allellere özgün ($\epsilon_2 > \epsilon_3 > \epsilon_4$) olduğu belirtilmiştir (112). Pham ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada, apoE allellere özgü antioksidan özelliğinin apoE izoformlarının yapılarındaki sistein amino asidi sayısı ile ilgili olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Yapısında 112. ve 158. amino asit dizilerinde sistein amino asiti içeren ϵ_2 allelinin en yüksek, yapısında 112. ve 158. amino asit dizilerinde sistein amino asiti içermeyen ϵ_4 allelinin ise en düşük antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (113).

Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmalarda, ϵ_4 allelinin azalmış antioksidan kapasitesinin talasemi major olan hastalarda kalp yetmezliği gelişimi için bir risk faktörü olabileceği görüşü öne sürülmüştür. ApoE'nin demir dahil metal bağlayıcı etkisinin, antioksidan özelliğinden sorumlu mekanizmalardan biri olduğu belirtilmektedir (112).

Sabbah ve ark. nın yaptığı çalışmada da, apoptozis yoluyla kardiyomyosit kaybına bağlı ventrikül fonksiyon bozukluğunun olabileceği öne sürülmüştür (114).

Erişkin kalp kası hücrelerinin kendilerini yenileyebilme özellikleri sınırlı olduğundan bu hücrelerin ölümü ile kardiyak performansın gittikçe azalabileceği bildirilmektedir. Bu da, ilerleyen kardiyak fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir. Ayrıca kardiyomyopatilerde görülen myosit apoptozisine, artmış reaktif oksijen ürünlerinin de neden olabileceği ve bu yolla apoptozisin ventrikül fonksiyon bozukluğunda etken olabileceği öne sürülmektedir (115).

Talasemi major hastalarında gelişen kardiyak disfonksiyonda da aynı mekanizmaların sorumlu olabileceği görüşündeyiz.

Literatür taramalarında, Türk toplumundaki talasemi major hastalarında, apoE allel dağılımlarını karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer toplumlarda ise, bu konuda sadece Economou-Petersen ve ark. ile Ferrara ve ark. nin yaptığı çalışmalara rastlanmıştır (14, 15).

Economou-Petersen ve ark. nin yaptıkları çalışmada, $\epsilon 3$ alleli, talasemi major ve kontrol gruplarında (sırasıyla %83.4 ve %88.2) birinci sıklıkta bulunmuştur. Talasemi major ve kontrol gruplarında $\epsilon 4$ alleli (sırasıyla %11, %6.5) ikinci sıklıkta bulunmuştur. $\epsilon 2$ alleli ise, talasemi major ve kontrol gruplarında sırasıyla %5.6 ve %5.3 sıklığında saptanmıştır. Bu araştırmacılar talasemi major ve kontrol grupları arasında allel sıklığı açısından anlamlı farklılık saptamamışlardır (15) (Tablo XIX, XX).

Ferrara ve ark. nin yaptıkları çalışmada ise, $\epsilon 3$ alleli, talasemi major ve kontrol gruplarında (sırasıyla %81.3, %83) birinci sıklıkta bulunmuştur. Kontrol grubunda $\epsilon 2$ alleli (%13), talasemi major grubunda ise $\epsilon 4$ alleli (%15.3), ikinci sıklıkta bulunmuştur. Bu araştırmacılar da talasemi major ve kontrol grupları arasında allel sıklığı açısından anlamlı farklılık saptamamışlardır (14) (Tablo XIX, XX).

Çalışmamızda, $\epsilon 3$ alleli, talasemi major ve kontrol gruplarında (sırasıyla %81.3 ve %86.3) birinci sıklıkta bulundu. Kontrol grubunda $\epsilon 2$ alleli (%7,5), talasemi major grubunda ise $\epsilon 4$ alleli (%15), ikinci sıklıkta bulundu. Biz de çalışmamızda, talasemi major ve kontrol grupları arasında allel sıklığı açısından anlamlı farklılık saptamadık. (Tablo XIX, XX). Denizli ilindeki talasemi major hastalarının apoE allel sıklığı Yunan toplumuna, Denizli ilindeki kontrol bireylerinin apoE allel sıklığı ise İtalyan toplumu ve Türkiye'nin Doğu bölgesine benzerlik göstermektedir.

Tablo XIX: Yunan, İtalyan toplumları ve Denizli ilindeki talasemi major hastalarının apoE allel sıklık dağılımları (14, 15)

Yer	Birey sayısı	ApoE allel (%)		
		ε2	ε3	ε4
Yunanistan	251	5.6	83.4	11
İtalya	110	3.3	81.3	15.3
Denizli	40	3.8	81.3	15

Tablo XX: Yunan, İtalyan toplumları, Denizli ili ve Türkiye’de yapılan bazı çalışmalardaki kontrol bireylerinin apoE allel sıklık dağılımları (14, 15, 116, 117)

Yer	Birey sayısı	ApoE allel (%)		
		ε2	ε3	ε4
Yunanistan	216	5.3	88.2	6.5
İtalya	200	13	83	4
Denizli	40	7.5	86.3	6.3
Türkiye (Güney bölgesi)	92	8.2	88.6	3.3
Türkiye (Doğu bölgesi)	252	11.5	79.8	8.7

Economou-Petersen ve ark. ile Ferrara ve ark. nın yaptıkları çalışmalarda, talasemi major hastalarında, apoE gen polimorfizminin kardiyak fonksiyonlar üzerine olan etkileri de araştırılmıştır. Her iki çalışmada da araştırmacılar; talasemi major hastalarını kardiyak durumlarına göre; [asemptomatik, asemptomatik-sol ventrikül dilatasyonu olanlar (sol ventrikül sistolik fonksiyonu normal) ve sol kalp yetmezliği olanlar] olarak 3 gruba ayırmışlar ve bu grupları E4 allel sıklığı açısından kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır (14, 15).

Bu çalışmalarda, kardiyak durumlarına göre asemptomatik-sol ventrikül dilatasyonu olan ve sol kalp yetmezliği bulunan beta talasemi major hastalarında, antioksidan aktiviteyi azalttığı bilinen apoE ε4 allelinin normal topluma oranla daha sık bulunmuş olması, bu hastalıkta apoE ε4 allelinin genetik bir risk faktörü olduğunu düşündürmektedir.

Bu görüşü kendi toplumumuzda da doğrulayabilmek için, çalışmaya dahil edilen Denizli ilindeki talasemi major hastalarını Amerikan Ekokardiyografi Derneği (ASE) kriterlerine (101-103) göre, diyastolik disfonksiyonu olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayırdık. Bu gruplar ile kontrol grubu arasındaki apoE genotipleri ve allelleri sıklıklarını karşılaştırdık.

Çalışmamızdaki talasemi major hastalarının sol ventrikül sistolik fonksiyonları normaldi. Çalışma grubumuzdaki talasemi major hastalarının sistolik fonksiyonlarının normal olması bu hastaların yaş ortalamalarının düşük olması ile açıklanabilir.

Economou-Petersen ve ark. nın yaptığı çalışmada, sol ventrikül dilatasyonu saptanan beta talasemi hastalarında, ϵ 4 allel sıklığının kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu (sırası ile %12.3 ve %6.5) bildirilmiştir ($p<0.05$). Bu sıklığın kardiyak yetmezliğin derecesi ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (15) (Tablo XXI).

Tablo XXI: Yunan toplumunda, kardiyak fonksiyonlarına göre talasemi major ve kontrol grubunda apoE allel sıklıkları dağılımı (15)

	ApoE allel (%)		
	ϵ 2	ϵ 3	ϵ 4
Asemptomatik (n= 151)	5.6	86.4	7.9
Asemptomatik-sol ventrikül dilatasyonu olan (n= 53)	4.7	83.0	12.3
Sol kalp yetmezliği (n= 47)	6.4	80.9	12.8
Kontrol (n= 216)	5.3	88.2	6.5

Ferrara ve ark. nın yaptığı diğer çalışmada ise, sol ventrikül dilatasyonu saptanan beta talasemi hastalarında ϵ 4 allel sıklığı %17, kontrol grubunda ise %4 olarak bulunmuştur ($p<0.05$) (14) (Tablo XXII).

Tablo XXII: İtalyan toplumunda, kardiyak fonksiyonlarına göre talasemi major ve kontrol grubunda apoE allel sıklıkları dağılımı (14)

	ApoE allel (%)		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Aseptomatik (n= 88)	10	86	4
Aseptomatik-sol ventrikül dilatasyonu olan (n= 12)	-	83	17
Sol kalp yetmezliği (n= 10)	-	75	25
Kontrol (n= 200)	13	83	4

Çalışmamızda ise, $\epsilon 4$ allel sıklığı, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan beta talasemi grubu ile ve kontrol grubunda sırası ile %16.7 ve %6.3 olarak bulundu. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan gruptaki $\epsilon 4$ allel sıklığı, kontrol grubuna göre daha yüksekti. Ancak, $\epsilon 4$ allel sıklığının gruplar arasındaki farklılığının istatistiksel analizi, çalışmadaki birey sayısı yeterlilik sağlayamadığından yapılamadı (Tablo XXIII).

Tablo XXIII: Çalışmamızda; sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda, apoE allel sıklıklarının dağılımı

	ApoE allel (%)		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayanlar (n = 13)	11.5	76.9	11.5
Aseptomatik- Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olanlar (n=27)	-	83.3	16.7
Kontrol (n = 40)	7.5	86.3	6.3

Çalışmamızda $\epsilon 2$ allele, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hasta grubunda rastlanmamıştır. İtalyan toplumunda yapılan çalışmada da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde sol ventrikül dilatasyonu saptanan beta talasemi hastalarında $\epsilon 2$ allele rastlanmamıştır (14). Bu veri, apoE2 polimorfizmine sahip kişilerde kalp hastalığı riskinin azaldığını öne süren önceki çalışmalar ile (63, 66-69) uyumludur. Bu nedenle, çalışmamızda kardiyak disfonksiyonu olan hastalarda $\epsilon 2$ allelinin bulunmaması, buna karşılık sağlıklı bireylerde bu allele rastlanmış olmamız, daha önceki çalışmalarda belirtilen $\epsilon 2$ allelinin bu

koruyucu özelliğinin talasemi major hastalarında görülebilen sol kalp yetmezliği gelişiminde de etkili olabileceğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Yukarıda bahsedilen iki çalışmadan başka, kardiyak disfonksiyon ve $\epsilon 4$ alleli ilişkisini inceleyen başka bir çalışma daha mevcuttur. Bu çalışmada apoE genotipleri ve kardiyak disfonksiyon arasındaki ilişki ileri yaş grubunda incelenmiştir. Çalışma grubu sol ventrikül diyastolik disfonksiyonunun bir ileri safhası olan sol ventrikül sistolik disfonksiyonu olan yaşlı bireylerden oluşturulmuştur. Bu çalışmada yazar, $\epsilon 4$ allelinin kardiyak disfonksiyon için bağımsız bir risk faktörü olduğunu belirtmiştir. Yazar ayrıca, sol ventrikül fonksiyonu üzerine $\epsilon 4$ allelinin olumsuz etkisi için kardiyomiyositlerde apoptozis mekanizmasının da önemli olabileceğini vurgulamıştır. Alzheimer'da $\epsilon 4$ allelinin, izoforma özgün nörotoksik etkisini Fas aracılıklı apoptozisde dahil olmak üzere çeşitli yollarla oluşturduğu bildirilmektedir. Kardiyomiyositlerde de Fas aracılıklı apoptozis olduğu gösterilmiştir (118).

Bleumink ve ark., $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine sahip 65 yaş üstü bireylerde kardiyak disfonksiyonun üç kat daha artmış olduğunu, $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipine sahip bireylerde ise kardiyak disfonksiyon açısından anlamlı bir artış olmadığını göstermişlerdir (118). Çalışmamızda ise, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major grubundaki bireylerden bir tanesi $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine sahipti. Çalışma grubumuzdaki 40 hastadan sadece bu birey tedavisine devam edilirken exitus olmuştu. Bu hastanın exitus nedeni öğrenilemedi.

ApoE'nin izoforma özgün olarak değişen, kolesterol seviyeleri ve ateroskleroz üzerindeki etkisi, beta-talasemi major'daki sol ventrikül yetmezliği ve $\epsilon 4$ allel birlikteliğini açıklayamamaktadır. Çünkü; ateroskleroz, sol ventrikül yetmezliği patofizyolojisinin bir göstergesi

değildir (15). Ayrıca talasemi major olan hastalarda lipid metabolizma bozukluğu sıklıkla gözlenen bir durum değildir (118, 119).

Economou-Petersen ve ark. ile Ferrara ve ark. nın yaptıkları çalışmalarda, sol ventrikül dilatasyonu olan hastaların %12.3 ve %17'sinde $\epsilon 4$ alleli saptanmıştır (14, 15). Bu oranların yüksek olmaması talasemi major hastalarında kardiyak komplikasyonların gelişiminde, transfüzyon sayısı, demir birikimi, şelasyon tedavileri ve viral miyokardiyal inflamasyon gibi diğer genetik ve çevresel faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu gelişiminde apoE polimorfizminin tek başına etkili olmadığı görüşündeyiz. Ancak, $\epsilon 4$ allele, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastalarında daha sık rastlanmaktadır. Bu sonuç, $\epsilon 4$ alleli taşıyan sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastalarının, $\epsilon 4$ alleli taşımayan hastalara göre sol kalp yetmezliği gelişimi açısından daha yüksek risk altında oldukları görüşünü ortaya çıkartmaktadır. Bu nedenle, $\epsilon 4$ alleli taşıyan sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastalarının kardiyak fonksiyonları açısından daha sıkı takip edilmeleri gerektiğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

1. 40 talasemi major hastası ve 40 kontrol bireyinin apoE genotipleri saptandı. Talasemi major grubu ile kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet olarak fark yoktu. Talasemi major grubunun boy ve ağırlıkları kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p=0.0001$).
2. Ekokardiyografik değerlendirme sonucu talasemi major hastalarının %67'sinde sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu saptandı.
3. Talasemi major hastalarında, ortalama ferritin düzeyi 4358 ± 1912 ng/ml, ortalama tanı koyulma yaşı 15.7 ± 19.4 ay, ortalama ilk transfüzyona başlanma yaşı 15.9 ± 19.3 ay idi.
4. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi, talasemi major ve kontrol gruplarında sırasıyla %67.5 ve %75 sıklığında bulundu. $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipine her iki grupta, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine ise kontrol grubunda rastlanmadı.
5. Talasemi major ve kontrol grupları arasında, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.161$).
6. $\epsilon 3$ alleli, talasemi major ve kontrol gruplarında sırasıyla %81.3 ve %86.3 sıklığında bulundu. Kontrol grubunda $\epsilon 2$ alleli (%7.5), talasemi major grubunda $\epsilon 4$ alleli (%15) ikinci sıklıkta bulunan allellerdi.
7. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmadı. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major grubundaki bireylerden bir tanesi $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine sahipti.
8. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan gruplar arasında, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.147$).

10. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hasta grubunda, $\epsilon 2$ alleli mevcut değildi. $\epsilon 3$ alleli, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarında sırasıyla %83.3 ve %84 sıklığında bulundu. $\epsilon 4$ alleli ise, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplarda sırasıyla %16.7 ve %7.5 sıklığında bulundu. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan ve olmayan gruplar arasında allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p=0.025$). Bu anlamlılığın sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan grupta, $\epsilon 2$ allelinin mevcut olmamasından kaynaklandığı istatistiksel olarak saptandı. $\epsilon 4$ allel sıklığının gruplar arasındaki farklılığının istatistiksel analizi, çalışmadaki birey sayısı yeterlilik sağlayamadığından yapılamadı.
11. Ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük olan talasemi major bireylerinde, $\epsilon 2$ allelinin bulunduğu $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmadı.
12. Talasemi major olan hastalarda, ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük ve 2500 ng/ml'den yüksek olan, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren ve içermeyen bireylerin sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=1.000$).
13. Ferritin düzeyleri 2500 ng/ml'den düşük olan talasemi major grubunda $\epsilon 2$ alleli mevcut değildi.
14. Talasemi major olan hastalarda, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan bireylerin, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan bireylere göre, ferritin düzey ortalamaları daha yüksek bulundu. Gruplar arasında ferritin düzey ortalamaları karşılaştırıldığında, bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmadı ($p=0.648$).
15. Talasemi major grubunda, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içeren bireylerin ferritin düzey ortalamaları, genotipinde $\epsilon 4$ alleli içermeyen bireylerin ferritin düzey ortalamalarına göre daha düşük bulundu. Gruplar arasında ferritin düzey ortalamaları karşılaştırıldığında, bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmadı ($p=0.715$).

ÖZET

Talasemi major hastalarının çoğunda, gerek yapılan kan transfüzyonlarına, gerekse gastrointestinal sistemden artmış demir emilimine bağlı olarak oluşan kronik ve aşırı demir birikimi nedeni ile dalak, kemik iliği, karaciğer, endokrin bezler, kalp gibi hemen hemen tüm organlarda işlev bozuklukları gelişmektedir .

Kalpte, serbest radikaller ve antioksidan mekanizma arasındaki dengesizlik mitokondri iç zarındaki elektron transport zincirinde bozulmaya neden olmakta bu da klinik olarak ölümcül kardiyomiyopati olarak gözlenen anormal enerji metabolizması ile sonuçlanmaktadır .

Talasemi major hastalarında en sık ölüm nedeni kardiyak komplikasyonlardır. Bu hastalarda erken dönemde diyastolik, geç dönemde sistolik kalp yetmezliği gelişmektedir .

Şelasyon tedavilerinden hastaların çoğu yarar görse de, tedaviye rağmen bazı hastalarda organ yetmezliği gelişmekte ve hastalar organ yetmezlikleri nedeniyle ölmektedirler.

ApoE izoformlarının beta talasemili major hastalarında sol kalp yetmezliği gelişimi için bir risk faktörü olabileceği görüşü öne sürülmektedir.

Çalışmamızda; Denizli ilindeki 40 talasemi major hastası ve 40 kontrol bireyinde PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak apoE polimorfizm genotiplerini saptadık. Talasemi major hastalarında en sık ölüm nedeni olan kardiyak fonksiyon bozukluğu ile apoE polimorfizmi arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırdık.

Talasemi hastalarını Amerikan Ekokardiyografi Derneği (ASE) kriterlerine göre, diyastolik disfonksiyonu olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayırdık. Ekokardiyografik değerlendirme sonucu talasemi major hastalarının %67'sinde (n=27) sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu saptandı. Bu gruplar ile kontrol grubu arasındaki apoE genotipleri ve allelleri sıklıklarını karşılaştırdık.

Çalışmamızda; ϵ 4 allel sıklığı, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major ve sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olmayan kontrol gruplarında sırasıyla %16.7 ve %6.3 olarak bulundu. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan gruptaki ϵ 4 allel sıklığı, kontrol grubuna göre daha yüksekti. ϵ 2 alleleline, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hasta grubunda rastlanmadı.

Sonuç olarak; talasemi major hastalarında sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu gelişiminde apoE polimorfizminin tek başına etkili olmadığı görüşündeyiz. Çalışmamızda kardiyak disfonksiyonu olan hastalarda ϵ 2 allelinin bulunmaması, buna karşılık sağlıklı bireylerde bu allele rastlamış olmamız, daha önceki çalışmalarda belirtilen ϵ 2 allelinin bu koruyucu özelliğinin talasemi major hastalarında görülebilen sol kalp yetmezliği gelişiminde de etkili olabileceğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. ϵ 4 alleleline, sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastalarında daha sık rastlanmaktadır. ϵ 4 alleli taşıyan sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastaları sol kalp yetmezliği gelişimi açısından daha yüksek risk altındadırlar. Bu nedenle, ϵ 4 alleli taşıyan sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu olan talasemi major hastalarının kardiyak fonksiyonları açısından daha sıkı takip edilmeleri gerektiğini düşünmekteyiz.

SUMMARY

In a majority of thalassemia major patients, organ dysfunctions such as in spleen, liver, endocrine glands, heart are seen as a result of chronic and excess iron accumulation. The causes of the iron overload are the repeated blood transfusions and increased iron absorption from the gastrointestinal system.

In heart, the imbalance in free oxygen radicals and antioxidant system causes an impairment in the electron transport chain in mitochondrial membrane, causing impaired energy metabolism which leads to cardiomyopathy.

Cardiac complications are the major cause of death in patients with thalassemia major. Diastolic dysfunction is an early event in these patients while systolic dysfunction is the late phase complication.

Though most of the patients benefit from the iron chelation therapy, some patients may die because of the organ failure.

It was proposed that apo E isoforms might be a risk factor in the development of left ventricular dysfunction in patients with beta-thalassemia major patients.

In the present study we detected the apo E polymorphism by PCR-RFLP in 40 thalassemia major patients and 40 control subjects in Denizli. We investigated the possible relationship among apo E polymorphism and cardiac dysfunction which is the leading cause in thalassemia major patients.

The patients with thalassemia major were arranged in two groups according to the American Association of Echocardiography (ASE) as with diastolic dysfunction and without diastolic dysfunction. In 67% (n=27) of thalassemia major patients with diastolic dysfunction was detected by echocardiographic evaluation. The frequencies of apoE genotypes and alleles were compared to those of the controls.

The $\epsilon 4$ allele frequencies in thalassemia major patients with left ventricular diastolic dysfunction and control group without left ventricular diastolic dysfunction were 16.7% and 6.3% respectively. The $\epsilon 4$ allele frequency in thalassemia major patients with left ventricular diastolic dysfunction was higher than the frequency in control group. In this study $\epsilon 2$ allele was not detected in the patients with diastolic dysfunction.

As a result; solely apo E polymorphism is not responsible for the development of left ventricular dysfunction in thalassemia major patients. It can be proposed that the detection of $\epsilon 2$ allele in healthy population and lacking in patients with cardiac dysfunction might be an indicator of the importance of $\epsilon 2$ allele in the prevention of left heart failure in thalassemia major patients. $\epsilon 4$ allele is frequent in thalassemia major patients with diastolic dysfunction; thalassemia patients with diastolic dysfunction having $\epsilon 4$ allele are in a higher risk of left heart failure. $\epsilon 4$ allele carrier thalassemia major patients with left ventricular dysfunction should be considered carefully for the cardiac functions.

KAYNAKLAR

- 1- Lukens JN. The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: Lee GJ, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, eds. Wintrobe's Clinical Hematology. Baltimore: Williams Wilkins, 1999: 1405-1448.
- 2- Gümürük F. Hemoglobin ve hemoglobinopatiler. In: İliçin G, Biberöğlu K, Süleymanlar G, Ünal S, eds. İç Hastalıkları. Ankara: Güneş Kitabevi, 2003: 1843-1854.
- 3- Forget BG. Thalassemia Syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT, eds. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: WB Saunders, 2003: 485-510.
- 4- Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. Haemostasis 1993; 1: 118-126.
- 5- Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT, Zoumbos NC. Heart failure in beta-thalassemia syndromes: a decade of progress. Am J Med 2005; 118: 957-967.
- 6- Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, Haj Khelil A, Feki M, Amri F, Selmi H, Bejaoui M, Miled A. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. Clin Chim Acta 2003; 338: 79-86.
- 7- Chen YY, Ho KP, Xia Q, Qian ZM. Hydrogen peroxide enhances iron-induced injury in isolated heart and ventricular cardiomyocyte in rats. Mol Cell Biochem 2002; 231: 61-68.

8- Filosa A, Valgimigli L, Pedulli GF, Sapone A, Maggio A, Renda D, Scazzone C, Malizia R, Pitrolo L, Lo Pinto C, Borsellino Z, Cuccia L, Capra M, Canistro D, Broccoli M, Soleti A, Paolini M. Quantitative evaluation of oxidative stress status on peripheral blood in beta-thalassaemic patients by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Br J Haematol* 2005; 131: 135-140.

9- Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM, Pennell DJ. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001; 22: 2171-2179.

10- Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C, Cappellini MD, Verlato G. Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 227–230.

11- Spirito P, Lupi G, Melevendi C, Vecchio C. Restrictive diastolic abnormalities identified by doppler echocardiography in patients with thalassemia major. *Circulation* 1990; 82: 88-94.

12- Lau KC, Li AM, Hui PW, Yeung CY. Left ventricular function in beta thalassemia major. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1046-1051.

13- Kremastinos DT, Tiniakos G, Theodorakis GN. Myocarditis in β Thalassemia major. *Circulation* 1995; 91: 66-71.

14- Ferrara M, Matarese SM, Francese M, Borrelli B, Coppola L, Coppola A, Larussi D, Esposito L. Role of apolipoprotein E polymorphism on left cardiac failure in homozygous beta thalassaemic patients. *Br J Haematol* 2001; 114: 959-960.

- 15- Economou-Petersen E, Aessopos A, Kladi A, Flevari P, Karabatsos F, Fragodimitri C, Nicolaidis P, Vrettou H, Vassilopoulos D, Karagiorga-Lagana M, Kremastinos DT, Petersen MB. Apolipoprotein E epsilon 4 allele as a genetic risk factor for left ventricular failure in homozygous beta-thalassemia. *Blood* 1998; 92: 3455-3459.
16. Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992.
- 17- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. Large Medical Publications, 1990.
- 18- Burtis CA, Ashwood ER. Fundamentals of clinical chemistry. In: Stein EA, Myers GL, eds. *Lipids, apolipoproteins and lipoproteins*. Philadelphia: Saunders Company, 1996: 375-401.
- 19- Zubay G. *Biochemistry*. Brown Publishers, 1993.
- 20- Baynes J, Dominiczah MH. *Medical Biochemistry*. Mosby, 1999.
- 21- Jackson RC, Gotto AM. Phospholipids in biology and medicine. *N Eng J Med* 1974; 290: 24-29.
- 22- Davidson MH. *The Mobile Lipid Clinic. A Companion Handbook*. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2002.
- 23- Kelley WN. *Textbook of Internal Medicine*. In: Rader DS, ed. *Disorders of lipid metabolism*. Lippincott Raven, 1997: 77-89.
- 24- Burtis C, Ashwood ER. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Aslan D, ed. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005.

- 25- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622–630.
- 26- Helisalmi S. Molecular genetics of alzheimer's disease with special emphasis on presenilin, amyloid beta precursor protein and apolipoprotein E genes. <http://www.uku.fi/neuro/44the.htm>, (Erişim: Kasım 2005).
- 27- Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 207–217.
- 28- Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171–4178.
- 29- Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994; 45: 249–302.
- 30- Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the alzheimer's disease connection. *Faseb J* 1996; 10: 1485–1494.
- 31- Garner B. Structure function relationship of apolipoprotein E oligosaccharides. <http://www.bmsf.unsw.edu.au/research/projects/apoE.html>, (Erişim: Kasım 2005).
- 32- Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Wu CS, Lindgren FT. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* 1988; 263: 6249–6258.
- 33- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr , Weisgraber KH. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J Biol Chem* 1988; 263: 6240–6248.

- 34- Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; 252: 1817–1822.
- 35- Dong LM, Parkin S, Trakhanov SD, Rupp B, Simmons T, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL, Weisgraber KH. Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 718–722.
- 36- Dong LM, Wilson C, Wardell MR, Simmons T, Mahley RW, Weisgraber KH, Agard DA. Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* 1994; 269: 22358–22365.
- 37- Wilson C, Mau T, Weisgraber KH, Wardell MR, Mahley RW, Agard DA. Salt bridge relay triggers defective LDL receptor binding by a mutant apolipoprotein. *Structure* 1994; 2: 713–718
- 38- Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes *J Lipid Res* 1999; 40: 1933-1949.
- 39- De Bellis G, Salani G, Panigone S, Betti F, Invernizzi L, Luzzana M. Apolipoprotein E genotyping by capillary electrophoretic analysis of restriction fragments. *Clin Chem* 1997; 43: 1321-1324.
- 40- Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 507–537.

41- Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Innerarity TL, Mahley RW. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibro-blasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin Invest* 1981; 68: 1075–1085.

42- Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257: 2518–2521.

43- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Rall SC Jr , Mahley RW. Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. *J Biol Chem* 1984; 259: 7261–7267.

44- Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1–16.

45- Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV. Disorders of lipid metabolism. In: JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg, PR Larsen, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders. 1998: 1099–1153.

46- Herz J. The LDL receptor related protein portrait of a multifunctional receptor. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 107–113.

47- Herz J, Willnow TE. Functions of the LDL receptor gene family. *Ann NY Acad Sci* 1994; 737: 14–19.

- 48- Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737: 197–222.
- 49- Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2173–2192.
- 50- Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr, Mahley RW. Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 1998; 273: 17483–17490.
- 51- Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr, Taylor JM, von Eckardstein A, Assmann G, Mahley RW. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1998; 273: 26388–26393.
- 52- Jong MC, Dahlmans VE, van Gorp PJ, Breuer ML, Mol MJ, van der Zee A, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E*3Leiden and human apolipoprotein C1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 934–940.
- 53- Rensen PCN, van Berkel TJC. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1996; 271: 14791–14799.
- 54- Huang Y, Ji ZS, Brecht WJ, Rall SC Jr, Taylor JM, Mahley RW. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic very low density lipoprotein (VLDL) production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2952–2959.

- 55- Van Dijk KW, Van Vlijmen BJM, Van't Hof HB, Van der Zee A, Santamarina-Fojo S, Van Berkel TJ, Havekes LM, Hofker MH. In LDL receptor-deficient mice, catabolism of remnant lipoproteins requires a high level of apoE but is inhibited by excess apoE. *J Lipid Res* 1999; 40: 336–344.
- 56- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1834–1838.
- 57- Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* 1977; 269: 604–607.
- 58- Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A, Martin M, Koren G, Cohen AR. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med* 1994; 331: 574-578.
- 59- Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res* 1982; 23: 911–914.
- 60- Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 1981; 20: 1033–1041.
- 61- Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Faergeman O, Dyerberg J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet* 1996; 98: 546–550.

62- Mahley RW, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1953–1980.

63- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1–21.

64- Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 268–285.

65- Utermann G. Genetic polymorphism of apolipoprotein E impact on plasma lipoprotein metabolism. In: Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G, eds. *Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias*. Amsterdam: Elsevier Science, 1985: 1–28.

66- Menzel H-J, Kladetzky R-G, Assmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 310–315.

67- Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 265–269.

68- Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, Steinmetz A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet* 1984; 65: 232–236.

- 69- Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet* 1982; 60: 344–351.
- 70- Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999; 40: 1933–1949.
- 71- Desai AK, Grossberg GT. Diagnosis and treatment of alzheimer's disease. *Neurology* 2005; 64: 34–39.
- 72- Yip AG, McKee AC, Green RC, Wells J, Young H, Farrer LA. ApoE, vascular pathology and the AD brain. *Neurology* 2005; 65: 259-265.
- 73- Lavados M, Farías G, Rothhammer F, Guillon M, Mujica MC, Maccioni C, Maccioni RB. ApoE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment. *Archives of Medical Research* 2005; 36: 474-479.
- 74- Nierenberg J, Pomara N, Hoptman MJ, Sidtis JJ, Ardekani BA, Lim KO. Abnormal white matter integrity in healthy apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Neuroreport* 2005; 16: 1369-1372.
- 75- Cuthbert JA, Lipsky PE. Modulation of human lymphocyte responses by low density lipoproteins (LDL): enhancement but not immunosuppression is mediated by LDL receptors. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 4539–4543.
- 76- Harmony JAK, Akeson AL, McCarthy BM, Morris RE, Scupham DW, Grupp SA. Immunoregulation by plasma lipoproteins. In: AM Scanu, AA Spector, eds. *Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins*. New York: Marcel Dekker, 1986: 403–452.

- 77- Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li H-M, Harmony JAK. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994; 159: 124–139.
- 78- Itzhaki RF, Lin W-R, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349: 241–244.
- 79- Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 1998; 39: 1740–1743.
- 80- Sinnis P, Willnow TE, Briones MRS, Herz J, Nussenzweig V. Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 945–954.
- 81- Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor–induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G₁ phase. *J Biol Chem* 1998; 273: 20156–20161.
- 82- Majack RA, Castle CK, Goodman LV, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM, Gebicke-Haerter PJ. Expression of apolipoprotein E by cultured vascular smooth muscle cells is controlled by growth state. *J Cell Biol* 1988; 107: 1207–1213.
- 83- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 1999; 24: 471–479.

84- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC. Direct binding of reelin to VLDL receptor and apoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 1999; 24: 481–489.

85- Trommsdorff M, Borg J-P, Margolis B, Herz J. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 33556–33560.

86- Ji ZS, Pitas RE, Mahley RW. Differential cellular accumulation/ retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than E4. *J Biol Chem* 1998; 273: 13452–13460.

87- Etiology of Microcytosis and Hypochromia. http://serpins.med.unc.edu/~fcc/Biology134_Folder/Scans/Handouts_01/9_12Thalas.pdf, (Erişim: Kasım 2005).

88- Quirolo K, Vichinsky E. Hemoglobin Disorders. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: WB Saunders, 2004: 1623-1634.

89- Aksoy M, Kutlar A, Kutlar F, Dincol G, Erdem S, Bastesbihci S. Survey on haemoglobin variants, beta thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and haptoglobin types in Turks from western thrace. *J Med Genet* 1985; 22: 288–290.

90- Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. Beta-thalassaemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Haematol* 2005; 22: 19-23.

- 91- Yıldırım Y, Kemahlı S, Dinçer N, Hasanoğlu A, Biberoğlu G, Cin Ş, Arcasoy A. Hyperzincuria and selective aminoaciduria in thalassemia. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 2000; 13: 199–204.
- 92- Weatherall DJ. The Thalassemias. In: Williams WJ, Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kips TJ, eds. *William's Hematology*. New York: Mc Graw-Hill, 1995: 581-615.
- 93- Orkin SH, Nathan DG. The thalassemias. In: Nathan DG, Oski FA, eds. *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia: WB Saunders, 2003: 842-920.
- 94- Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Los Angeles: OPAMP Technical Books, 2000.
- 95- Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron Deficiency and Overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003; 40-61.
- 96- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202: 199-211.
- 97- Jessup M, Manno CS. Diagnosis and management of iron-induced heart disease in Cooley's anemia. *Ann NY Acad Sci* 1998; 850: 242-50.
- 98- Seymen HO, Özçelik D, Gülyavaş T, Mengi M, Seymen P, Yiğit G. Effect of iron overloading on the tissue levels of iron. *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30: 207-213.
- 99- Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: From equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 641-655.

100- Koppenol WH. Facts and Fiction in Free Radical Biochemistry: The Haber-Weiss Cycle. <http://www.medicine.uiowa.edu/frrb/SRFRS/SRFRS-papers/SRFRS-2000-KoppenolW.pdf>, (Erişim: Kasım 2005).

101- Pearlman AS, Gardin JM, Martin RP, Parisi AF, Popp RL, Quinones MA, Stevenson JG. Guidelines for optimal physician training in echocardiography. Recommendations of the American Society of Echocardiography Committee for Physician Training in Echocardiography. *Am J Cardiol* 1987; 60: 158-163.

102- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58: 1072-1083.

103- Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, et al. American Society of Echocardiography Committee on standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms: Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2: 358–367.

104- Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

105- Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of the human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.

106- Ferrara M, Matarese SM, Borrelli B, Perrotta A, Simeone G, Greco N, Larussi D, Esposito L. Cardiac involvement in beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia. *Hemoglobin* 2004; 28: 123-129.

107- Spirito P, Lupi G, Melevendi C, Vecchio C. Restrictive diastolic abnormalities identified by doppler echocardiography in patients with thalassemia major. *Circulation* 1990; 82: 88-94.

108- Lau KC, Li AM, Hui PW, Yeung CY. Left ventricular function in beta thalassemia major. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1046-1051.

109- Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Sem Hematol* 1989; 26: 277-285.

110- Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. Thalassemi. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004; 14-34.

111- Marcus RE, Davies SC, Bantock HM, Underwood SR, Walton S, Huehns ER. Desferrioxamine to improve cardiac function in ironoverloaded patients with thalassaemia major. *Lancet* 1984; 1: 392-393.

112- Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and b-amyloid peptides. *Nat Genet* 1996; 4: 55-61.

113- Pham T, Kodvawala A, Hui DY. The receptor binding domain of apolipoprotein E is responsible for its antioxidant activity. *Biochemistry* 2005; 20: 7577–7582.

114- Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 704–712.

115- Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res* 2001; 89: 198–200.

116- Attila G, Acarturk E, Eskandari G, Akpınar O, Tuli A, Kanadası M, Kayrin L. Effects of apolipoprotein E genotypes and other risk factors on the development of coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim Acta*. 2001; 312: 191-196.

117- Duzenli S, Pirim I, Gepdiremen A, Deniz O. Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population from eastern Turkey. *J Neurogenet*. 2004; 18: 365-375.

118- Bleumink GS, van Duijn CM, Kingma JH, Witteman JC, Hofman A, Stricker BH. Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J* 2004; 147: 685-689.

119- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Kosma K, Barbetseas J, Karagiorga M, Ladis I, Stefanadis C. Distribution of serum lipids and lipoproteins in patients with beta thalassaemia major; an epidemiological study in young adults from Greece. *Lipids Health Dis* 2004; 15: 1-8.