

T1858

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**İDİYOPATİK SİROZLU HASTALARDA HFE GEN +  
MUTASYONLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİYLE  
TARANMASI**

**Saffet ÖZTÜRK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. İbrahim KESER**

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
(Proje no: 2004020122.007) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

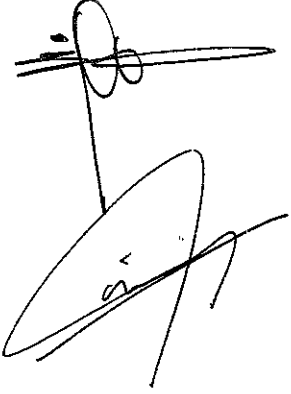
Antalya, 2005

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/07/2005

**Tez danışmanı: Doç. Dr. İbrahim KESER**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



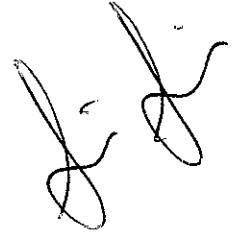
**Üye: Prof. Dr. Güven LÜLEÇİ**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Üye: Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Üye: Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



**Üye: Doç. Dr. Dinç DİNÇER**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



**ONAY:**

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05/08/2005 tarih ve 13/108 sayılı kararıyla kabul edilmiştir



**Prof. Dr. Ramazan DEMİR**  
Akdeniz Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

Karaciğerde görülen önemli hastalıklardan biri olan siroz, çeşitli dış ve iç etiyojik faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Karaciğer sirozu anatomi, etiyojisi, aktivite, prognoz ve evresine göre sınıflandırılmaktadır. Çok iyi tanımlanmış etiyojik faktörlerin dışlandığı siroz, kriptojenik (idiyopatik, sebebi bilinmeyen) siroz olarak adlandırılmakta ve siroz hastalarının % 5-10'unu oluşturmaktadır. Karaciğerdeki demir birikimi, en sık görülen risk faktörlerindedir. Demir metabolizmasında işe karışan birçok genetik faktör vardır. Bunlardan birisi, HFE (hemokromatozise neden olan gen) genidir. HFE gen mutasyonları, karaciğer demir birikimine ve dolayısıyla fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır.

Projemizin amacı, idiyopatik siroz tanısı almış olan 16 hastada HFE genindeki C282Y, H63D ve S65C mutasyonları ile hastalık arasında ilişki olup olmadığını PCR-RFLP yöntemi ile araştırmaktır. Periferik kandan DNA izolasyonunu takiben, her üç mutasyonun yer aldığı DNA bölgeleri PCR yöntemi ile amplifiye edildi. PCR ürünleri, mutasyon bölgelerine özgü restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesilen fragmentlerin elektroforezde yürütülmesiyle ortaya çıkan bant durumuna göre genotipler belirlendi.

Onaltı kriptojenik siroz hastasının birisinde H63D mutasyonu heterozigot, birisinde ise homozigot olduğu gözlenirken, 141 sağlıklı kontrol bireyin 30'unda H63D mutasyonu heterozigot, 2'sinde ise homozigot olarak saptandı. C282Y ve S65C mutasyonları ise hem hasta hem kontrol grubunda görülmedi. Hasta ve kontrol bireylerinin genotipleri ve biyokimyasal demir parametreleri (serum demir konsantrasyonu, ferritin, toplam demir bağlama kapasitesi ve transferin doygunluğu) karşılaştırıldığında, ferritin, serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluğu H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olan bireylerde, heterozigot ve normal genotipli olanlara göre daha yüksek olduğu bulundu. HFE gen mutasyonlarının (C282Y, H63D ve S65C) idiyopatik sirozlu hastalarda siroz oluşumuna neden olan etiyojik etmenlerden birisi olup olmadığı tartışıldı.

**Anahtar kelimeler:** İdiyopatik siroz, HFE geni, PCR, RFLP.

## ABSTRACT

Cirrhosis that is one of the important disease of the liver results from external and internal etiologic factors. Liver cirrhosis is classified according to anatomy, etiology, activity, prognose and stage. Cirrhosis, excluded from the etiological factors and defined very well, is called idiopathic cirrhosis and constitutes 5-10 % of cirrhosis patients. Iron overload is the most frequent risk factor in the liver. Several genetic factors are involved in the iron metabolism. One of them is the HFE gene, and HFE gene (for hemochromatosis) mutations cause iron overload and so that affect function of the liver negatively.

The aim of our project, is to investigate the mutations (C282Y, H63D, S65C) in the HFE gene in patients with idiopathic cirrhosis using PCR-RFLP, and to determine the possible relation between HFE gene mutations and the disease. HFE gene mutations were investigated with PCR-RFLP technique. After DNA isolation from peripheral blood, the DNA regions including every three mutations were amplified with PCR technique. PCR products were digested with specific restriction enzymes for mutation sites. Digested fragments were run on the electrophoresis, and genotypes were determined according to band patterns.

One of the 16 idiopathic cirrhosis patients is heterozygous and one of them is also homozygous for H63D mutation. In 141 healthy control group, 30 and 2 of them were determined heterozygous and homozygous, respectively. C282Y and H63D mutations were not found in both the patients and the control group. When genotypes and biochemical iron parameters (serum iron concentration, ferritin, total iron binding capacity and transferrin saturation) of the patients and the control individuals were compared, the ferritin, serum iron concentration and transferrin saturation values of these subjects who were homozygous for the H63D mutation were higher than the heterozygous and normal genotypes for the this mutation. It was discussed whether the HFE gene mutations (C282Y, H63D and S65C) are the etiologic factors which cause the idiopathic cirrhosis.

**Key words:** Idiopathic cirrhosis, HFE gene, PCR, RFLP.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığım süre boyunca her zaman göstermiş olduğu yakın ilgisi ve yol göstericiliği için tez danışman hocam Doç. Dr. İbrahim KESER ve sayın Prof. Dr. Güven LÜLECI'ye,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Yüksek lisans tezi hasta grubunun oluşturulmasındaki yardımları için Doç. Dr. Dinç DİNÇER ve Uzm. Dr. Hilmi DİKİCİ'ye,

Hasta ve kontrol grubu bireylerinden kanların alınmasında gösterdikleri özen ve yardımları için Teknisyen Ekrem ÇELİK, Hemşire Hayriye BAŞER'e

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Yüksek lisans tez çalışmama katılan tüm hasta ve kontrol grubu bireylerine,

Bugünlere gelmemde her türlü desteği ve sevgisini veren çok değerli aileme ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Zeynep BOLAT ÖZTÜRK'e en içten dileklerle teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Karaciğerin Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu	2
2.2. Karaciğer Hastalıkları	3
2.3. Karaciğer Sirozu	3
2.3.1. Karaciğer Sirozunda Rol Oynayan Etiyolojik Faktörler	6
2.3.2. Kalıtsal Hemokromatozis ve Siroz Arasındaki İlişki	7
2.3.3. İdiyopatik Siroz	7
2.3.4. Karaciğer Sirozunda Genetik Faktörlerin Rolü	7
2.4. HFE Geni, Protein Yapısı ve Fonksiyonları	8
2.5. HFE Gen Mutasyonları	10
2.6. HFE geni ile İlgili Çalışmalar	12
GEREÇ VE YÖNTEMLER	
3.1. Hasta ve Kontrol Grupları	17
3.2. Kullanılan Yöntemler	17
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	17
3.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler	17
3.2.1.2. İşlemler	18
3.2.2. PCR Yöntemi	18
3.2.3. RFLP Yöntemi	19
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	20
BULGULAR	21
TARTIŞMA VE SONUÇLAR	30
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ALL</b>	: Akut lenfoid lösemi
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>AML</b>	: Akut miyeloid lösemi
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>CE</b>	: Kapiller elektroforez
<b>DMT-1</b>	: İki değerlikli metal taşıyıcı protein
<b>DNTP</b>	: Deoksिनुकлеотидтрифосфат
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetikasit
<b>ELISA</b>	: Enzim ilişkili immünosorbent analizi
<b>GSTM1</b>	: Glutasyon S-transferaz M1
<b>GSTP1</b>	: Glutasyon S-transferaz P1
<b>HFE</b>	: Hemokromatozis gen
<b>IGF-1</b>	: İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	: Potasyum bikarbonat
<b>KRT-8</b>	: Keratin 8
<b>KRT-18</b>	: Keratin 18
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>MTAP</b>	: Metiltioadenozin fosforilaz
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	: Amonyum klorür
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
<b>SDS</b>	: Sodyumdodezilsülfat
<b>SF</b>	: Sulandırma faktörü
<b>SSCP</b>	: Tek zincir konformasyonel polimorfizm
<b>TBE</b>	: Tris Borat EDTA
<b>TfR-1</b>	: Transferin reseptörü-1
<b>TfR-2</b>	: Transferin reseptörü-2
<b>UK</b>	: United Kingdom
<b>US</b>	: United State
<b>USG</b>	: Ultrasonografi
<b>WBL</b>	: Lökosit lizis (White Blood Lysis)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. HFE geninin genel yapısı.	8
2.2. HFE proteini genel yapısı.	9
2.3. HFE proteininin fonksiyonu	10
4.1. C282Y mutasyonu PCR ürünü ve restriksiyon enzimi kesim profili.	22
4.2. H63D mutasyonu PCR ürünü ve restriksiyon enzimi kesim profili.	22
4.3. S65C mutasyonu PCR ürünü ve restriksiyon enzimi kesim profili.	23



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. İdiyopatik siroz hastalarının DNA verileri	21
4.2. İdiyopatik siroz hastalarının tanı yaşları ve HFE gen mutasyon sonuçları.	24
4.3. Kontrol grubunda HFE gen mutasyonlarının dağılımı.	24
4.4. Hasta ve kontrol bireylerinin yaş, cinsiyet ve ortalama biyokimyasal demir parametrelerinin karşılaştırılması.	25
4.5. İdiyopatik siroz hastalarının cinsiyet dağılımı ve demir parametreleri.	26
4.6. H63D mutasyon genotipine göre kontrol grubu bireylerinin ortalama demir parametreleri.	28
4.7. H63D mutasyonu açısından idiyopatik siroz hastaları ve kontrol bireylerinin biyokimyasal demir parametrelerinin karşılaştırılması.	28
4.8. Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete bağlı biyokimyasal demir parametrelerinin ve H63D mutasyonu açısından genotiplerin dağılımı	29

## GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, vücutta önemli fonksiyonları olan bir organ olup birçok etiyolojik faktör nedeniyle, farklı hastalık oluşumları belirlenmiştir. Bu hastalıklardan birisi de sirozdur. Siroz oluşumu ile ilgili yapılmış olan araştırmalarda, hastalığın etiyolojisinde viral hepatit (hepatit B, hepatit C), uzun süreli ilaç kullanımı, fazla miktarda alkol tüketimi gibi birçok faktörün etkili olduğu belirtilmektedir. Buna karşın etiyolojik etkeni belirlenememiş siroz hastalarının sayısı ise her geçen gün artmaktadır. İdiyopatik siroz olarak tanımlanan siroz üzerinde çok yönlü çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda çeşitli metabolik bozukluklar sonucunda meydana gelen karaciğerdeki demir birikiminin siroz gelişimi üzerindeki etkisi in vitro ve in vivo olarak yapılmış olan çalışmalarla gösterilmiştir. Vücutta demir birikimine neden olabilen HFE gen mutasyonları, HFE proteininin demir metabolizmasındaki görevini yerine getirmesini engellemekte ve sonuçta duodenumdan fazla miktarda demir Emilimi gerçekleştirilmektedir. Vücuda alınan fazla demir başta karaciğer olmak üzere, pankreas, hipofiz bezi, eklem bölgeleri, kalpte birikmekte ve bu organların fonksiyonlarını olumsuz şekilde etkilemektedir. Özellikle, karaciğerdeki demir konsantrasyonu belli miktarın üzerine çıktığında hepatositleri zarara uğratmakta ve siroz gelişimine neden olabilmektedir.

İdiyopatik siroz hastalarının genetik etiyolojisiyle ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. Ancak yapılan literatür taramasında idiyopatik siroz ile demir birikimine neden olan HFE geniyle ilgili Türkiye’de yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, idiyopatik siroz hastalarında HFE gen mutasyonlarının (C282Y, H63D ve S65C) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırma, 16 idiyopatik siroz hastası ve 141 sağlıklı kontrol birey üzerinde gerçekleştirildi. HFE gen mutasyonlarının araştırılması ile idiyopatik sirozun genetik etiyolojisinden birisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçların idiyopatik siroz araştırmalarına önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğerin Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu

Karaciğer vücudumuzdaki en büyük organ olup 1200-1500 gram ağırlığında, böbrek, duodenum, kolon ve mide ile komşuluk yapmakta ve karın boşluğunun sağ üst kısmında, diyaframın altında yer almaktadır (1, 36) Karaciğer, tanımlama kolaylığı açısından anatomik sınıflamaya göre falsiform ligamenti tarafından sağ ve sol lob olarak iki bölüme ayrılmıştır (1, 37).

Karaciğer, Glisson kapsülü olarak bilinen sert bir fibröz kapsülle sarılmış ve sıkı bağ dokusundan yapılmıştır. Bol kollajen lif ve az oranda elastik lif içeren bu kapsül aynı zamanda lobülleri de oluşturmaktadır. Lobül (lobçuk), sayıları bir milyonu bulan, ortalama çapları 0.7-2 mm olan karaciğerin küçük morfolojik fonksiyonel birimlerdir. Glisson kapsülünün üzerinde yer alan ve organı en dıştan saran seröz bir zar bulunmaktadır. Visseral periton adı verilen bu zar tek katlı yassı bir epitel türü olan mezotelyum ve ince bir bağ dokusundan oluşmaktadır. Her lobülün merkezinde yer alan merkezi ven ise hepatik venlere açılmaktadır. Karaciğere kan akımı % 30 oranında hepatik arterlerden, % 70 oranında ise portal ven aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (1, 36, 37).

Karaciğer de pek çok organ gibi histolojik olarak parankima ve stroma bölümlerinden oluşmaktadır. Parankima, organın kendine özgü fonksiyonlarını yerine getiren hücre ve yapıların oluşturduğu organ içindeki küçük organizasyonların tümünden oluşmaktadır. Parankima yapısına, diğer yapılara desteklik sağlayan ve çoğu kez organın çatı ve iskeletlerini oluşturan bağ dokusundan meydana gelen yapılar ve bu yapılar içinde organın içerisine girip dağılan damar ve sinirlerin oluşturduğu destek yapıların tümü ise stromayı meydana getirmektedir. Karaciğer parankim hücreleri olan hepatositler, 20-35 µm çaplı, altı veya daha fazla yüzeyi olan büyük poligonal hücrelerdir. Hepatositler, karaciğer hücre popülasyonunun % 80'ini meydana getirirler. Her bir hepatositin yüzey komşulukları; komşu hepatosite sıkıca temas eden yüz, safra kanalikülüne bakan yüz ve sinüzoidlere bakan yüzlerden oluşmaktadır. Hepatositlerin sinüzoidlere bakan yüzündeki hücre membranında çok sayıda mikrovillus bulunmaktadır (1, 37).

Karaciğerin vücudun hemen bütün sistemleriyle ilişkisi olup, son derece karmaşık ve önemli fonksiyonları vardır (1). Fonksiyonları arasında, vücudun ihtiyaç duyduğu besin maddelerini (çeşitli proteinler, glukoz, vitaminler ve yağlar) metabolize etmek, safra üretimi (safra, yağların ve yağda eriyen vitaminlerin emilimi), lenf üretimi, plazma proteinlerinin sentezi, keton bileşiklerinin yapımı; alkol, amonyak, nikotin, çeşitli tipteki ilaçlar ve sindirim sonucu ortaya çıkan zararlı toksinleri zararsız hale çevirimi (detoksifikasyon), gastrointestinal sistemden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi, üre yapımı, bazı hormonların inaktivasyonu, dalakla birlikte yaşlı eritrositlerin

dolaşımdan alınması ve demir içeriklerinin kemik iliğine yönlendirilmesi yer almaktadır (1, 14, 37).

## 2.2. Karaciğer Hastalıkları

Bugüne kadar çok sayıda karaciğer hastalığı tanımlanmıştır. Bunlar arasında alfa-1 antitripsin eksikliği, otoimmün hepatit, biliyer atrezi, kronik hepatit, karaciğer kanseri, siroz, kistik karaciğer hastalıkları, galaktozemi, karaciğer yağlanması, Gilbert sendromu, hemokromatozis, primer biliyer siroz, Rey's sendromu, tip 1 glikojen depo hastalığı, trozinemia, Wilson's hastalığı yer almaktadır. Önemli karaciğer hastalıklarından birisi olan alfa-1 antitripsin eksikliği, hepatit ve siroz oluşumuna neden olabilen genetik bir hastalık olup, çocuklarda yaygın olarak görülmektedir. Otoimmün hepatit ise vücudun karaciğer hücrelerine karşı antikor oluşturmasına bağlı olarak ortaya çıkan immünolojik bir hastalıktır (53, 54).

Karaciğer hastalıklarına yol açan etkenler arasında viral enfeksiyonlar, ilaçlar, toksinler, safra yolları lezyonları, metabolizma bozuklukları, hipoksi ve tümörler yer almaktadır. Dünya ölçeğinde düşünüldüğünde, karaciğerin en önemli hastalığı viral enfeksiyonlardır. Bazı virüsler akut veya kronik hepatite yol açabilmektedirler. Kronik hepatit, siroza dönüşebilen bir karaciğer hastalığıdır. Virüslerin neden olabileceği tablolar arasında ölümcül bir kanser olan hepatosellüler karsinoma da yer almaktadır. İlaçların metabolizmasında ve genel olarak detoksifikasyonunda önemli rolü olan karaciğer, toksik zedelenmeler için özellikle risk altındadır. Ayrıca, safra yolundaki daralmalar ve tıkanmalar, karaciğerde bakteriyel enfeksiyonlara neden olabileceği gibi, safra akımının uzun süre engellendiği durumlarda da siroz meydana gelebilmektedir. İskemik, otoimmün veya enfeksiyöz süreçler safra yollarının yıkımına neden olabilmektedir. Ağır beslenme bozuklukları ve doğumsal enzim eksiklikleri gibi metabolik bozukluklar karaciğer hücrelerinin normal işleyişini olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Bu gibi durumlarda, hepatositlerde anormal birikimler ortaya çıkabilmekte, bunların doğumsal olanları depo hastalıkları olarak bilinmektedir. Karaciğerin primer tümörleri, B ve C tipi hepatit virüs enfeksiyonlarının yaygın olduğu ülkelerde sık görülmektedir. Karaciğer ayrıca, hemen her karsinomanın metastaz yapabildiği bir organdır; bu nedenle, metastatik karaciğer tümörleri primer tümörlerden daha sık görülmektedir (53, 73, 74).

## 2.3. Karaciğer Sirozu

Karaciğerde görülen önemli hastalıklardan birisi olan siroz, hepatosellüler nekrozu takiben diffüz fibrozis ve rejenerasyon nodüllerinin oluşması ile karakterize kronik bir karaciğer hastalığıdır. Sadece nodüler rejenerasyon ya da sadece fibrozisin olması siroz tanısı için yeterli değildir, mutlaka iki patolojik sürecin birlikte olması gerekmektedir (3, 13, 36, 37).

Karaciğer sirozu, çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmasına rağmen, hücre temelinde oluşum sürecinde hep aynı mekanizma rol oynamaktadır. Siroz oluşum sürecinde hücre ölümü, halka biçiminde bağ doku artışı ve yumrular biçiminde doku yinelenmesi görülmektedir. En önemli belirtileri ise portal ven sisteminde kan basıncı

yükselmesi ve ilerleyen karaciğer yetmezliğidir (3, 13, 36, 37). Karaciğer sirozunun prognozu, hastalığın nedenine, evresine ve tedavi olanaklarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (2, 3).

Siroz subklinik bir hastalık olduğu için genellikle ileri evrelere ulaşmadan belirti ve bulguları çok fazla değildir. Bu hastalarda görülen belirti ve bulgular doğrudan sirozdan kaynaklanabileceği gibi hastalığın bir sonucu olan hepatosellüler yetmezlik ve portal hipertansiyondan da kaynaklanabilmekte ve etiyojisi ne olursa olsun bu belirti ve bulgular tüm siroz hastalarında benzerlik göstermektedir (3).

İştahsızlık, uykuya meyil, ateş, pigmentasyonda artma, jinekomasti, beyaz tırnak, parmaklarda çomaklaşma, parotis bezinde büyüme, testiküler atrofi, ödem, dalakta büyüme, çabuk yorulma, bulantı, sindirim bozuklukları, bağırsak işlevlerinde düzensizlikler (kabızlık), yağlı besinleri sindirememesi, aşırı gaz, kilo kaybı, idrar renginde koyulaşma, libidoda azalma, tekrarlayan mukozal ve gastrointestinal kanamalar ve hepatosellüler yetmezliğe bağlı olarak mental fonksiyonlarda bozukluk gibi belirtiler özgül olmayan siroz belirtilerindedir (3, 13). Hastalığın ileri evresi dekompanze siroz olarak tanımlanmakta ve bu dönemde vücut sirozu düzenleyici etki gösteremediği için klinik belirtiler ağırlaşmaktadır. İştahsızlık tam bir iştah kaybına dönüşmekte, hastada sürekli kilo kaybı ve genellikle dokularda su tutulamamaktadır. Karında asit, bu hastalarda görülen ve birçok fizyolojik problemin ortaya çıkmasına neden olan önemli bir semptomdur (3, 13). Asit gelişimiyle birlikte kanda albumin düzeyi düşer, aldosteron salgısı artar ve özellikle toplardamar sisteminde kan basıncı yükselir. Bazı durumlarda hastada sarılık gelişebilir, deride sarılık gelişmemesine rağmen gözlerde her zaman sarı bir gölge oluşmaktadır. Özellikle yanaklar ve burun kırmızı renk almıştır. Bütün bu belirtiler iç salgı sistemi bozukluklarına, yani karaciğer işlevlerinin bozulmasıyla ortaya çıkan hormonal dengesizliğe bağlıdır (13, 14).

Sirozun klinik belirtileri arasında yer alan portal hipertansiyon iç kanamalara yol açabilmektedir. Portal ven, bağırsaklardan ve dalaktan gelen bütün kanı karaciğere geçiren ana damardır. Diğer bir belirti olan dalak büyümesi, genellikle portal vendeki yüksek tansiyona bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Büyüyen dalak kemik iliğinin etkinliğini azaltmakta; alyuvar, akyuvar ve trombosit üretimini engelleyebilmektedir. Sirozlularda sık görülen kanama, trombosit sayısının azalması dışında karaciğer tarafından üretilen protrombin, fibrinojen, faktör V, faktör VII, faktör X moleküllerinin yeterli sentezlenememesinde rol oynamaktadır. Böylece hastada kansızlık ve vücut direncinde genel bir zayıflama ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hastada davranış değişikliği ve ağızda hastalığa özgü (amonyak gibi) bir koku oluşmakta ve sonunda hasta komaya girmektedir (13).

Siroz durumunda karaciğerin histolojik yapısı bozulmakta, diffüz bir kollajen artışı meydana gelmektedir. Bu artış nedeniyle sinüzoidler kapillere dönüşmüş ve hepatosit membranı ile kan arasındaki metabolik alışveriş sistemi bozulmuştur (3, 15). Sirozun ilerlemesi durumunda protein miktarında özellikle albumin düzeyinde ve çizgili kas protein sentezinde azalma, amino asit profilinde bozulma meydana gelebilmektedir.

Bu oluşumların mekanizmasında hormon moleküllerine karşı direnç gelişimi, sitokin, IGF-1 ve leptin gibi kimyasal moleküllerin rol oynadıkları düşünülmektedir (42).

Karaciğer sirozunun tanısının konulması, el ile muayene, çeşitli teknik ve tetkiklerin uygulanması ile gerçekleştirilir. Karaciğer ele geliyorsa sertleşmiştir, ama yapısı her zaman tekdüze değildir. Yüzeyi pütürlü olduğundan düzensiz, kenarları ise net ve keskindir (13). Laboratuvar bulguları da siroz tanısında önemli bir yer tutmaktadır. Ancak laboratuvar değerlerinin normal olması sirozun kesinlikle olmadığını göstermemektedir. Örneğin en sık kullanılan karaciğer fonksiyon testlerinden AST'nin hastaların % 90'ında, ALT'nin ise sadece % 65'inde normalin üzerinde olduğu görülmüştür. Laboratuvar bulgularından plazma albumin miktarında azalma ve protrombin zamanındaki uzama siroz tanısının konulmasında en önemli faktörlerdendir. Bilirubindeki artış ise akut hepatitteki durumdan farklı olarak hastalığın ileri evrede olduğunun ve kötü prognozunun bir göstergesidir. Diğer laboratuvar bulguları ise anemi, lökopeni, trombositopeni, koagülasyon bozukluğu, idrardaki ürobilinojen oranında yükselme ve serum gamaglobulinde artmadır (3, 13, 36). Siroz tanısında, görüntüleme yöntemleride kullanılmaktadır. Siroz olduğu düşünülen hastalarda ilk uygulanacak tetkiklerin başında ultrasonografi (USG) gelmektedir. Bu tetkikle karaciğerin büyüklüğü, şekli, safra taşı (sirozlu hastalarda sık görülmekte), portal hipertansiyonun varlığı ve hepatosellüler karsinom durumu incelenebilmektedir. Ayrıca endoskopi, peritonoskopi yöntemlerinden de yararlanılabilmektedir. Siroz tanısının kesinleştirilmesinde karaciğer biyopsisinin kesinlikle yapılması gerekmektedir. Karaciğerden alınan biyopsi hastalığın derecesi, aktivitesi ve etiyolojisi hakkında bilgi vermekte ve biyopside fibrozisin yanısıra rejenerasyon nodüllerinin görülmesiyle tanı kesin olarak konulabilmektedir. Ayrıca alınan biyopsi örneğinde siroz sürecinden sorumlu olan hepatosellüler nekroz da gözlenebilmektedir (3, 15).

Karaciğer sirozu anatomi, etiyoloji, aktivite, prognoz ve evresine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma hem tedavi yönteminin seçiminde hem de prognozun belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Karaciğer sirozu anatomik sınıflandırma ile makronodüler, mikronodüler ve karışık tip olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Makronodüler siroz, değişik çapta nodül ve septalarla karakterize olup, bazen nodüllerin çapı 5 cm olabilmektedir. Post nekrotik sirozlar makronodüler siroz grubuna girmektedir. Mikronodüler siroz, 1 cm'den küçük, eşit çaptaki nodüllerin arasında yer alan ince septumlar ile karakterizedir. Alkolizmin yanısıra yaşlılık, kansızlık ve beslenme bozuklukları da mikronodüler tipin oluşmasına neden olabilmektedir. Zamanla hastalığın ilerlemesi ve rejenerasyonun başlamasıyla mikronodüler siroz daha çok makronodüler bazende karışık tipe dönüşebilmektedir. Sirozlu karaciğerin büyük kısmı ise makro ve mikronodüler tipin özelliklerinin birlikte gözlemlendiği karışık tip siroz grubuna girmektedir (36).

Klinik evresine göre siroz iki grupta toplanmaktadır. Bunlar kompanze veya latent evredeki siroz ve dekompanze evredeki sirozdur. Dekompanzasyon kriterleri arasında asit, ödem veya hepatik ensefalopatinin görülmesi yer almaktadır (36).

Etiyolojik sınıflandırma ise sirozun oluşum sürecinde etkili olan faktöre bağlı olarak, enfeksiyöz (hepatit B ve hepatit C), alkol kaynaklı, metabolik ve genetik (hemokromatozis, Wilson's hastalığı, alfa-1 antitripsin eksikliği, tip 4 glikojen depo hastalığı, galaktozemi), kolestatik (primer ve sekonder biliyer siroz), immünolojik (lupoid hepatit, primer biliyer siroz), kimyasal ajanlar (ilaçlar, toksinler), bazı operasyonlar, Hindistan çocukluk çağı sirozu ve idiyopatik (sebebi belli olmayan) olarak gerçekleştirilmektedir (36, 37).

### 2.3.1. Karaciğer Sirozunda Rol Oynayan Etiyolojik Faktörler

Karaciğer sirozunun etiyojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Genetik yatkınlık dışında en önemli nedenleri arasında, viral hepatit (hepatit B, hepatit C, hepatit (B+D)), alkol, metabolik etkenler (hemokromatozis, Wilson's hastalığı, alfa-1 antitripsin eksikliği, tip 4 glikojen depo hastalığı, tirozinemi, galaktozemi), ilaçlar, toksinler (metatraksat, metildopa, izoniazid, amiodaron, A vitamini ve karbon tetraklorür), diğer faktörler (immünolojik, sarkoidoz, jejunoileal bypass, kalıtsal hemorajik telenjiyektazi, biliyer siroz, sklerozan kolanjit, kardiyovasküler hastalıklar) yer almaktadır (3).

Siroz etkenlerinden birisi olan alkol, batı ülkelerinde ve USA'de siroz nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Kuzey Amerika'da siroz nedeniyle meydana gelen ölümlerin % 44'ü, Kanada da % 80'i alkol kaynaklıdır (14, 55). Alkol, siroz dışında karaciğer yağlanması ve alkolik hepatitede neden olabilmektedir. Alkolik karaciğer hastalığının gelişmesinde alınan alkol miktarı ve süresi (etanol için 5 yıl süresince 160 gr/gün alkol alınımı alkolik siroz ve hepatit gelişimi için yeterlidir), cinsiyet (kadınlarda alkolik siroz ve hepatit erkeklere göre daha hızlı gelişmekte), genetik faktörler (karaciğerde alkol metabolizmasında görev alan enzim sistemleri genetik faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilmekte) ve beslenme rol oynamaktadır (3, 24) Alkole bağlı olarak gelişen sirozda karaciğer önce büyür, fakat hastalığın son evresinde ise küçülmektedir (13). Duodenumdan emilen alkol, kan dolaşımı ile karaciğere gelmekte ve burada metabolize edilmesi sonucunda toksik kimyasallara dönüşmektedir. Bu toksinlerden birisi olan asetaldehit fazla miktarda sitokin üretimine, bu sitokinler de inflamasyona ve doku hasarına yol açmaktadırlar. Zarar görmüş olan karaciğer, yağ asitlerini yıkıma uğratamamakta ve yağ üretimine neden olan maddeleri de metabolize edemediği için karaciğerde yağlanma meydana gelmektedir. Alkol kaynaklı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (steatohepatit), alkol kaynaklı karaciğer hastalığına benzerlik göstermekte, hepatit ve özellikle yağlı karaciğer oluşumu nedeniyle siroz gelişimi indüklenmektedir. Genellikle fazla alkol tüketimi olmayan bireylerde görülür. Şiddetli obezite ve tip 2 diyabet, alkol kaynaklı olmayan karaciğer hastalığı için risk altında olan hastalık gruplarıdır. Tip 2 diyabetli hastaların % 50'sinde ve obez hastaların, obezitenin şiddetine bağlı olarak, % 75'inde siroz gelişebilmektedir. Siroz gelişimine neden olan ikinci etken hepatit B veya hepatit C kaynaklı kronik hepatitdir. Genel olarak kronik hepatit C hastalarının % 10-15'inde, hepatit B hastalarının ise % 5-10'nunda siroz gelişebilmektedir. Virüsler ya da diğer etkenler inflamasyona sebep olarak karaciğere zarar vermekte böylece siroz oluşumunu indüklemektedirler (16, 73).

Diğer bir etiyolojik faktör olan otoimmünite karaciğerde, otoimmün hepatit ve primer biliyer siroza neden olmaktadır. Bazı otoimmün bozukluklarda olduğu gibi, genetik defektleri olan immün sistem kendi hücre ve organlarına karşı reaksiyon göstermektedir. Safra kanallarının immün reaksiyona maruz kalması sonucunda oluşan primer biliyer siroz ise kadınlarda (genellikle 50 yaş) % 95 oranında görülmektedir (14, 73).

Karaciğer sirozunun etkenleri arasında kistik fibrozis, alfa-1 antitripsin eksikliği, galaktozemi, glikojen depo hastalığı, Wilson's ve kalıtsal hemokromatozis gibi kalıtsal hastalıklarda yer almaktadır. Kalıtsal hemokromatozis demirin karaciğerde yüksek konsantrasyonda birikmesine ve hepatosit hasarına, fibroze, hepatik siroza neden olabilmektedir. Nadir görülen diğer faktörler ise şistozomiazis, duodenuma uygulanan bazı operasyonlar, uzun süreli bazı kimyasallara (arsenik, metatraksat) maruz kalınması ve bazı ilaçların (toksik dozda vitamin A alınması) uzun süreli kullanılmasıdır (35).

### **2.3.2. Kalıtsal Hemokromatozis ve Siroz Arasındaki İlişki**

HFE gen mutasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan ve duodenum tarafından fazla miktarda demir emilimi ile karakterize olan kalıtsal hemokromatozis hastalığı, beyaz ırkta sık görülmektedir (6). Farklı populasyonlarda farklı oranlarda görülen kalıtsal hemokromatozisin prevalansı, Kuzey Avrupa'da 1/200-400, USA'de 1/250-300, Kafkas populasyonunda ise 1/200-500'dir (5, 6, 9, 11, 21, 20, 30).

Kalıtsal hemokromatozis hastalarında, duodenum tarafından emilen fazla miktardaki demir başta karaciğer olmak üzere birçok organda birikmektedir. Karaciğerde biriken fazla demir, serbest radikallerdeki artış ve demirin neden olduğu diğer metabolik bozukluklar nedeniyle hepatositler zarar görmekte ve bu durum karaciğer sirozunun gelişimine neden olabilmektedir. Arezzini ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde gerçekleştirilmiş olan araştırmada karaciğerde biriken demirin siroz oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir (28).

### **2.3.3. İdiyopatik Siroz**

İdiyopatik siroz, siroz oluşumuna neden olduğu bilinen etiyolojik faktörlerin araştırılması sonucu etkenin belirlenemediği sirozdur. Siroz hastalarının yaklaşık % 5-30'u idiyopatik siroz tanısı almaktadır (16, 49). Son yıllarda idiyopatik sirozla ilgili olarak birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılmış olan araştırmalar sonucunda karaciğerde demir birikimi (10), obezite ve tip 2 diyabet en yaygın görülen risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır (16, 45, 51). Ayrıca, şeker hastalığı, hiperlipidemi ve obezite gibi hastalıklar nedeniyle ortaya çıkan alkol kaynaklı olmayan yağlı karaciğer oluşumu, idiyopatik sirozlu hastalarda görülen risk faktörlerindedir (46, 49, 50, 56, 57).

### **2.3.4. Karaciğer Sirozunda Genetik Faktörlerin Rolü**

Karaciğer sirozunun etiyolojisinde rol oynayan faktörlerden birisi olan genetik ile ilgili olarak çok sayıda mutasyon ve polimorfizm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karaciğer sirozunun patogeneğinde genetik heterojenite vardır. Örneğin, keratin 8



(KRT-8) ve keratin 18 (KRT-18) genlerinde meydana gelen mutasyonların hastalık üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (17, 58).

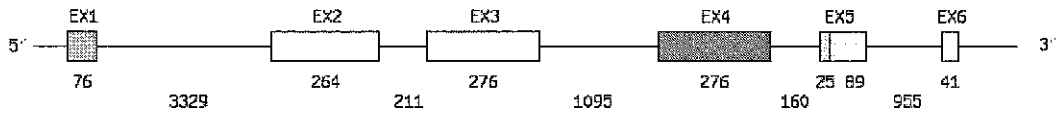
Ayrıca, karaciğerin fonksiyonlarında önemli görevleri olan bazı genlerin sirozun oluşum ve gelişim sürecinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Metionin ve adenin metabolizmasında görev alan metiltioadenozin fosforilaz geninin (MTAP), hepatokarsinoma ve karaciğer sirozu hücre hatlarında yapılmış olan çalışmalarda ekspresyon düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (44).

Karaciğer sirozuyla ilgili olarak çok sayıda genetik polimorfizm çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. DNA tamir geni olan XRCC1'in Arg399Gln polimorfizmi, 97 siroz hastası ve 97 kontrol bireyi üzerinde çalışılmış ve anlamlı bir ilişki kurulmuştur. Fazla alkol tüketimi olan polimorfik bireylerde, bu polimorfizmin serbest radikallerin etki düzeyini arttırdığı ve böylece siroz gelişimine neden olduğu belirtilmektedir (39).

Ayrıca, demir metabolizmasında görev alan HFE geninde meydana gelen mutasyonların da siroz oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. HFE proteininin fonksiyonunu yerine getirememesi, karaciğerde demir birikimine neden olmakta ve demirin serbest radikal oluşumunu indüklemesine bağlı olarak karaciğer sirozu gelişmektedir (2, 22, 23, 59).

#### 2.4. HFE Geni, Protein Yapısı ve Fonksiyonları

HFE geni, ilk olarak Feder ve arkadaşları tarafından 1996 yılında klonlanmış olup 6 nolu kromozomun kısa kolunda (6p21.3), HLA lokusunun da bulunduğu bölgede yer almaktadır (10, 12, 18). Bu gen, 6 ekzon, 5 intron içermekte ve toplam 44356 baz çiftinden oluşmaktadır (Şekil 2.1.).

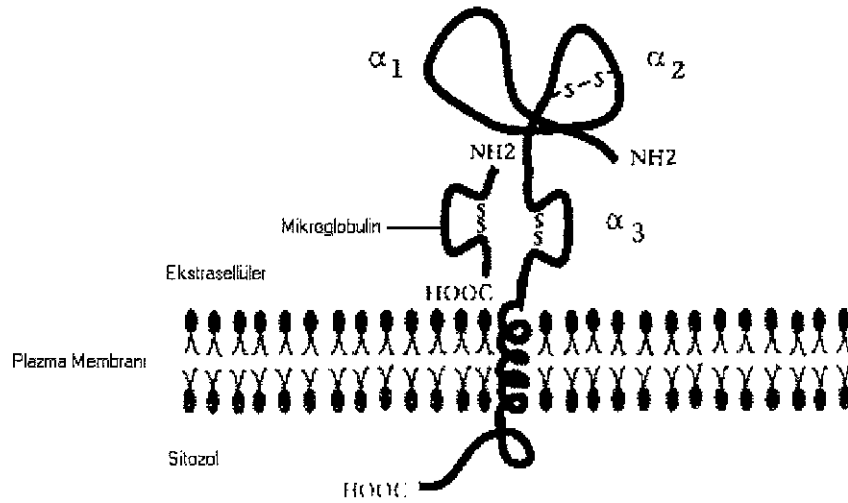


Şekil 2.1. HFE geninin genel yapısı

HFE geni, karaciğer hücreleri tarafından eksprese edilmediği için hepatositlerdeki demir transportunda primer görev almamaktadır. HFE genindeki mutasyonlar direkt olarak karaciğerdeki demir düzenlemesini etkilemezken, plazmadaki transferine bağlı ve transferine bağlı olmayan demir miktarını arttırmakta ve sonuçta karaciğer hücrelerindeki depo demir düzeyi yükseltmektedir (11). Karaciğer dışında kalp, pankreas, bazı endokrin bezlerde, eklem bölgelerinde ve deride de demir birikimi meydana gelebilmektedir (4, 5, 43).

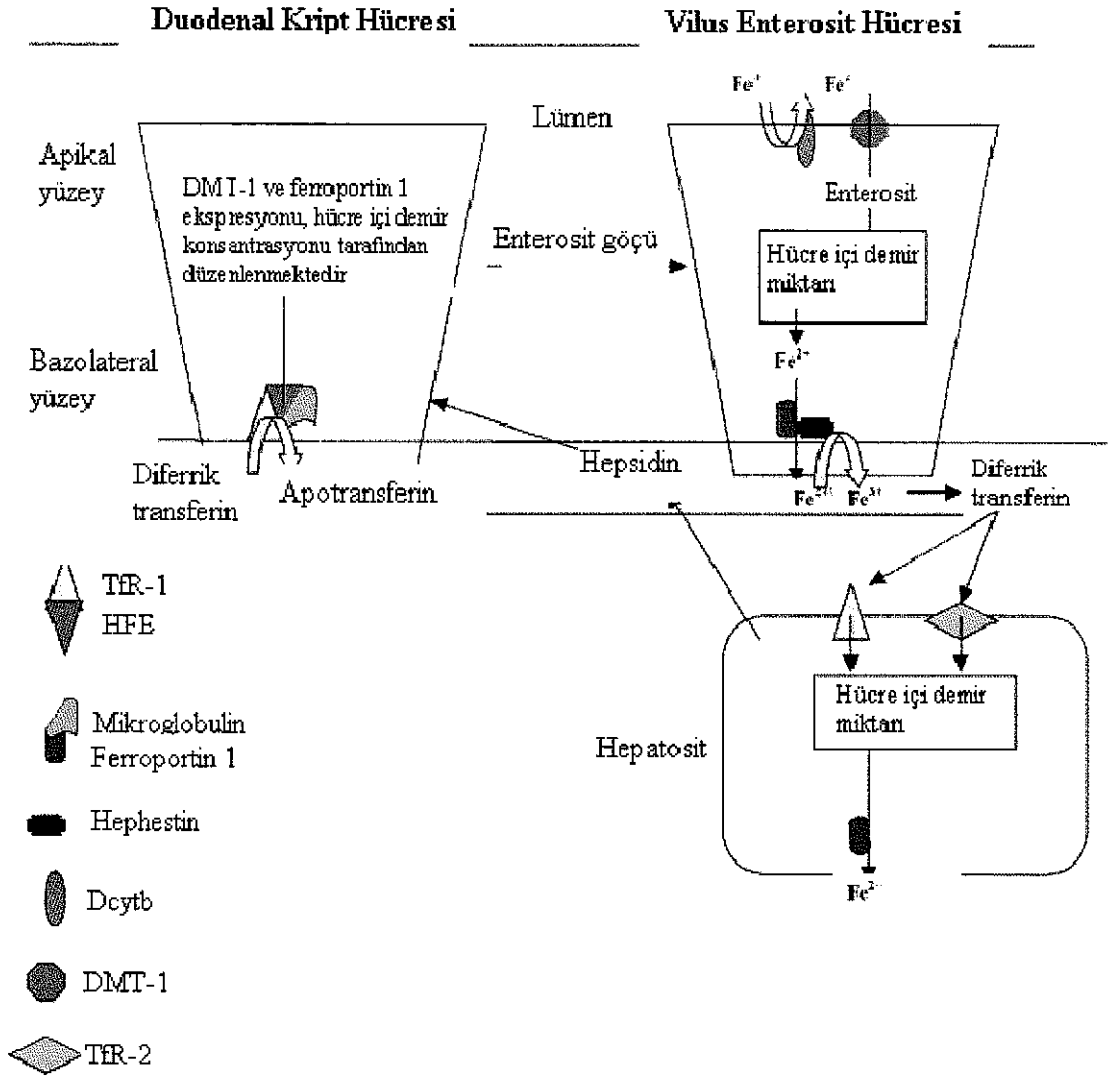
HFE proteini yapı olarak büyük bir hücre dışı, transmembran ve kısa bir stoplazmik domainden oluşmaktadır (5, 69). Hücre dışı domaini  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ve  $\alpha 3$

unitelerinden oluşmakta, ikinci ve üçüncü ünitelerde disülfid bağları yer almaktadır. Bu protein, demir emiliminde görev yapan gastrointestinal sistemdeki hücreler, makrofajlar ve bazı hücreler tarafından eksprese edilmektedir (Şekil 2.2) (2, 12, 18, 69). HFE proteini, 22 aminoasitlik sinyal peptid ile birlikte, toplam 343 aminoasitten oluşmakta ve  $\beta$ 2-mikroglobulin molekülü ile etkileşime girerek, diferrik transferinden transferin reseptörü 1 aracılı demir alınımını regüle etmektedir (6). Proteindeki yapısal bozukluklar, duodenal kript hücreleri tarafından demir alınımını azaltmakta ve bu durumda daha fazla demir emilimi için villuslardaki DMT-1 taşıyıcı proteininin ekspresyon düzeyi arttırılmaktadır (2, 8, 69, 70, 71).



Şekil 2.2. HFE proteini genel yapısı.

HFE proteini, hücre içi demir metabolizmasındaki düzenleyici görevini diğer moleküllerle etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Duodenal kript hücresinin bazolateral yüzeyinde yer alan HFE proteini  $\beta$ 2-mikroglobulin ve transferin reseptörü 1 (TfR-1) ile ilişki içindedir. Transferin molekülüne bağlı olan demir, transferin reseptörü 1 tarafından kript hücresi içine alınmaktadır. Kript hücresi içindeki demir miktarının azalması durumunda bu hücreler villus enterosit hücrelerine farklılaşmaktadır. Bağırsak lümeninden  $Fe^{+2}$  iyonlarının alınmasından sorumlu olan DMT-1 ve hücre içine alınmış olan demirin bazolateral yüzeyden plazmaya verilmesinde görev alan ferroportin-1 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri kript hücre içi demir düzeyinin düşmesi durumunda arttırılmaktadır. Villus enterosit hücreleri tarafından alınan  $Fe^{+2}$ , plazma membranında yer alan hephestin molekülü tarafından  $Fe^{+3}$ e dönüştürülmektedir. Ferrik formda plazmaya verilen demir iyonu transferin molekülü tarafından alınıp karaciğere ve diğer organlara taşınmaktadır. Karaciğer hücrelerinde TfR-1 ve transferin reseptörü 2 (TfR-2) reseptörleri tarafından hücre içine alınan demir hepatosit hücrelerinde ferritin olarak depolanmakta ve vücudun ihtiyaç duyması durumunda kan dolaşımına verilmektedir (Şekil 2.3.) (2, 70, 71).



Şekil 2.3. HFE proteininin hücredeki fonksiyonu

## 2.5. HFE Gen Mutasyonları

HFE geninde kalıtsal hemokromatozis hastalığının ortaya çıkmasında etkin rol oynadığı bilinen iki yanlış anlamlı (missens) mutasyon bilinmektedir. Bunlardan birincisinde 282 pozisyonundaki sistein aminoasiti yerine tirozin aminoasiti (C282Y), ikinci mutasyon tipinde ise 63. pozisyonundaki histidin yerine aspartat aminoasiti (H63D) geçmektedir (8, 9). Yapılan araştırmalar sonucunda, 1999 yılında, serin amino asitinin sistein amino asidine dönüştüğü S65C mutasyonu da belirlenmiştir. Bu mutasyonun hastalığın oluşumunda hafif düzeyde etkili olduğu belirtilmektedir (8). Feder ve arkadaşları tarafından yapılmış olan ilk çalışmada, tipik hemokromatozis fenotipinde olan 178 hastanın 148'nin (% 83) C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant olduğu, hastaların % 4'nün ise bileşik heterozigot (C282Y/H63D) olduğu belirlenmiştir (5, 8).

C282Y mutasyonu, HFE genin 845 nükleotidi olan guanin (G) bazının adenin (A) bazına transisyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu nokta mutasyonu

sonucunda 282. pozisyonundaki sistein aminoasitinin yerine tirozin aminoasiti geçmektedir (5, 6, 9-12, 21, 32). HFE proteininde korunmuş olan sistein aminoasitinin değişmesi proteinin ekstrasellüler domainindeki disülfid köprüsünün bozulmasına ve sonuçta HFE proteini ile  $\beta$ 2-mikroglobulin arasındaki ilişkinin olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır. Bu mutasyon sonucunda, transferin reseptörü 1'in diferrik transferine olan afinitesinin azalması ya da TfR-1'in geri dönüşümündeki yavaşlama nedeniyle fazla demir emiliminin meydana geldiği tahmin edilmektedir (5, 6, 12, 21). C282Y mutasyonu açısından mutant bireylerde enterosit membranında +2 değerlikli demirin hücre içine alınmasında görevli DMT-1 ve ferroportin 1 ekspresyon düzeyinde artış olduğu HFE geni knock-out fare modellerinde gösterilmiştir. Bu iki molekülün üretimindeki artış intestinal sistem tarafından fazla demir absorpsiyonuna neden olmaktadır (5).

C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant olan hastalarda demir birikimi nedeniyle şiddetli klinik belirtiler görülmektedir (9). Avrupa popülasyonunda C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant olanların oranı % 3-6 arasında değişmektedir. US'de homozigot mutant C282Y prevalansı %1.2-4.9 arasında olmasına rağmen, Asya ve Afrika'da bu mutasyon belirlenmemiştir (19). Heterozigot C282Y mutasyon frekansı % 24.8 ile İrlanda popülasyonunda en yüksek oranda görülmektedir. Hindistan, Orta Doğu ve Avustralya popülasyonlarında ise C282Y mutasyonu için homozigot mutant hasta belirlenmemiş olup, heterozigotların oranı ise % 0-5 arasında olduğu tespit edilmiştir (32). Lucotte ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen araştırmada 20 Avrupa popülasyonuna ait araştırma değerlendirilmiş ve C282Y mutasyonu alel frekansının en fazla % 6.88'lik oranla Fransa ve İngiltere'deki Kelt popülasyonunda olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler HFE gen mutasyonlarının Kelt orijini olabileceğini desteklemektedir (32).

C282Y mutasyonu dışında, bazı hemokromatozis hastalarında H63D mutasyonu da görülmektedir. H63D mutasyonu, HFE genindeki 187. nükleotid olan C'nin G'ye transversiyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu transversiyon tipi nokta mutasyonu sonucunda histidin aminoasitinin yerine aspartik asit geçmektedir (5, 9, 18, 19, 32). H63D mutasyonu, HFE proteininin  $\beta$ 2-mikroglobuline bağlanmasını etkilememekte, fakat hücre transfeksiyon analizi çalışmalarında transferin reseptörünün diferrik transferine olan afinitesini azalttığı belirlenmiştir. H63D mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan bireylerde hafif düzeyde demir birikiminin meydana geldiği ortaya konulmuştur (5, 6, 21). Avrupa popülasyonlarında C282Y ve H63D mutasyonlarının birlikte bulunduğu bileşik heterozigot (C282Y/H63D) ve homozigot H63D mutasyonları yaklaşık % 2, heterozigot H63D ise % 15-22 oranında olduğu bildirilmektedir (32).

HFE genindeki C282Y, H63D mutasyonları, karaciğer fibrozisi ve sirozu için bağımsız risk faktörleridir (22, 23). Mutasyonların bu etkileri karaciğerde demir miktarını arttırmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, C282Y mutasyonu bakımından homozigot olan hastalarda siroz oluşumunun yanı sıra bilirubin, ferritin, ALI ve AST düzeylerinde de artış olabilmektedir (22).

S65C mutasyonu, HFE geninin 2. ekzonunda, 193. nükleotidi olan A'nın T'ye dönüşümü sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu transversiyon tipindeki nokta

mutasyonu sonucunda 65. pozisyondaki serin aminoasitinin yerine sistein aminoasiti geçmektedir (5, 6, 9). Bu mutasyon, transferin reseptörünün transferine olan afinitesini azaltmakta H63D ve C282Y mutasyonları kadar etkili olmadığı halde HFE geninin ekspresyonu üzerinde etkili olabileceği bildirilmektedir (6). S65C'nin genel popülasyondaki alel frekansı yaklaşık % 1.5'dur (9). H63D ve C282Y mutasyonları belirlenememiş kalıtsal hemokromatozis hastalarının % 7.8'nin S65C değişimine sahip olduğu belirlenmiştir (21, 39).

Hemokromatozis hastalarının bazılarında görülen bileşik heterozigot genotipinin penetransı % 0.5-1.5 olarak saptanmıştır (9). C282Y/H63D ve C282Y/S65C genotiplerinin klinik tablo üzerindeki etkileri oldukça azdır. Bileşik heterozigotlar kalıtsal hemokromatozis hastalarının % 4-7'sinde görülmekte (15, 21) ve hastalığa özgü klinik belirtilerin sadece % 11'nin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (8).

## 2.6. HFE Geni ile İlgili Çalışmalar

HFE gen mutasyonlarının sıklığını belirlemek için Türkiye'de yapılmış olan çalışma sayısı oldukça sınırlı (32, 40, 41) olmasına rağmen diğer ülkelerde bu konuyla ilgili çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Farklı popülasyonlarda gerçekleştirilmiş olan araştırmalarda HFE gen mutasyonları (C282Y, H63D, S65C ve diğer nadir görülen mutasyonlar) için farklı frekanslar belirlenmiştir. Papazoglou ve arkadaşları 2003 yılında 264 erişkin Yunan popülasyonunda yaptıkları HFE gen mutasyonu taramasında hiçbir bireyde C282Y mutasyonu belirleyememişlerdir. PCR-RFLP yöntemi kullanılmış olan araştırmada, bireylerin % 16.2'sinde heterozigot H63D ve % 0.75'inde ise homozigot H63D genotipi bulunmuştur (75).

Cimbuova ve arkadaşları Çek Cumhuriyetinde yaptıkları çalışmada, 257 yenidoğanı C282Y ve H63D mutasyonları açısından değerlendirmişlerdir. C282Y mutasyonu için 254 bireyde homozigot mutant birey görülmezken, 20 bireyin (% 7.87) ise heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir. H63D mutasyonu 257 bireyde analiz edilmiş ve 2 bireyin (% 0.78) homozigot mutant, 69 bireyin (% 26.84) ise heterozigot taşıyıcı olduğu görülmüştür (77).

Pietrapertosa ve arkadaşları, İtalya'nın Apulian bölgesinde yaptıkları araştırmada 500 sağlıklı bireyi değerlendirmişlerdir. Çalışmada C282Y, H63D ve S65C mutasyonlarının dışında V53M, H63H, Q127H, E168Q, E168stop, W169stop, V59M, Q238P değişimleri de analiz edilmiştir. C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant bireyin olmadığı belirlenirken, bireylerin % 3'nün ise bu mutasyon için heterozigot taşıyıcı olduğu ortaya konulmuştur. H63D mutasyonu için homozigot mutantların oranı % 1, heterozigot taşıyıcıların yüzdesi ise % 26 olarak belirlenmiştir. Sadece beş birey S65C mutasyonu açısından taşıyıcı olarak belirlenirken, diğer HFE gen mutasyonları hiçbir sağlıklı bireyde gözlenmemiştir. Heterozigot H63D genotipindeki bireylerin transferin doygunluk değerinin normal genotipli bireylere göre, daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, İtalya'da genel popülasyonda yapılmış olan diğer çalışmalarda HFE gen mutasyonları alel frekansları (C282Y) % 0.5, (H63D) % 12.6 ve (S65C) % 1.1 olarak bildirilmiştir (76).

Altes ve arkadaşları, İspanya'nın Catalonia bölgesinde rastgele seçilmiş 1146 yenidoğan üzerinde yaptıkları araştırmada C282Y, H63D ve S65C mutasyonlarının alel sıklıklarını LightCycler yöntemi ile belirlemişlerdir. 1043 yenidoğandaki alel frekansları (C282Y) % 0.03, (H63D) % 0.2, (S65C) % 0.01 olarak hesaplanmıştır (79).

Milman ve arkadaşları, Danimarka'da Danes etnik grubunda yaptıkları araştırmada 2501 bireyi C282Y ve H63D mutasyonlarını PCR temelli bir teknikle değerlendirmişlerdir. Analizler sonucunda genotip frekanslarını % 0.36 (C282Y/C282Y), % 10.6 (C282Y/N), % 1.6 (H63D/H63D), % 23.4 (H63D/N), % 1.4 (C282/H63D) olarak, alel frekanslarını ise % 5.7 (C282Y), % 13.3 (H63D) şeklinde belirlemişlerdir (80).

Choi ve arkadaşları, rastgele seçilmiş 240 Koreli bireyde C282Y ve H63D mutasyon sıklıklarını PCR-RFLP yöntemi ile analiz etmişlerdir. Araştırmada, C282Y mutasyonu hiçbir bireyde belirlenmezken, 18 bireyin (% 7.5) H63D mutasyonu açısından heterozigot olduğunu ortaya koymuşlardır. H63D mutasyonu için alel frekansı ise % 3.8 olarak hesaplanmıştır (81).

Moczulski ve arkadaşları, Polonya'da Slavic popülasyonda C282Y ve H63D mutasyon sıklığını 871 bireyde, PCR temelli yöntem ile değerlendirmişlerdir. Analizler sonucunda bireylerin % 6.0'ı C282Y/N ve sadece bir bireyin ise bu mutasyon için homozigot olduğunu ortaya koymuşlardır. C282Y mutasyonu alel frekansı % 3.1, H63D mutasyonun alel frekansı ise % 1.5 olarak tespit edilmiştir. Onüç bireyin (% 1.5) bu iki mutasyon için bileşik heterozigot genotipinde olduğu gözlenmiştir (83).

Sassi ve arkadaşları, 570 Tunus popülasyonunda HFE gen mutasyonlarının (C282Y, H63D) sıklığını PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Mutasyonların alel frekansları % 15.17 (H63D) ve % 0.09 (C282Y) olarak hesaplanmıştır (88).

Türkiye'de, PubMed'te yayınlanmış, HFE gen mutasyonları popülasyon taramasıyla ilgili ilk çalışma, 2003 yılında Barut ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, 4633 sağlıklı erişkinin (yaş ortalaması  $35 \pm 8$  olan ve 3827 erkek, 806 kadın) transferin doygunluğu (TS) ölçülmüştür. İlk ölçüm sonucu  $TS \geq \% 50$  olanlarda bir gece açlık döneminden sonra tekrar ölçüm gerçekleştirilmiştir. Serum ferritin değerlerinin ölçümü ve C282Y, H63D mutasyon analizleri transferin doygunluk değeri  $\geq \% 50$  olan bireylerde yapılmıştır. HFE gen mutasyonuna sahip olup olmadığına bakılmaksızın ferritin değeri 200 ng/ml'den yüksek olanlarda karaciğerden biyopsi alınarak histolojik değerlendirme ile demir miktarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. TS değeri % 50'nin üzerinde olan 26 bireyde HFE gen mutasyon analizi ve ferritin düzeyleri ölçülmüştür. Mutasyon analizleri sonucunda, H63D mutasyonu için 11 hastanın taşıyıcı (10 erkek, 1 kadın), 1 erkek hastanın ise homozigot mutant olduğu belirlenirken, hiçbir bireyde C282Y mutasyonu gözlenmemiştir (32).

Bozkaya ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılmış olan diğer bir araştırmada Türkiye'de hemokromatozis taraması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada,

3060 kan veren bireyin değerlendirilmesi sonucunda sadece 5 bireyin (% 8) demir bağlama kapasitesinin açlık döneminde  $< 28 \mu\text{M}$  olduğu tesbit edilmiş ve bu kişilerde HFE gen mutasyon taraması yapılmıştır. İki bireyin H63D mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir (40).

Şimşek ve arkadaşları tarafından 2004 yılında gerçekleştirilmiş olan diğer araştırmada, 2677 sağlıklı kan verici birey transferin doygunluğu açısından değerlendirilmiştir. Transferin doygunluğu  $> \% 45$  olan 86 kan veren birey çalışma grubu olarak belirlenmiş ve transferin doygunluğu  $< \% 45$  olan 57 kontrol bireyi HFE gen mutasyonları, ferritin ve ALI açısından incelenmiştir. H63D mutasyonu çalışma grubunda % 27.32, kontrol grubunda ise % 21.05 olarak belirlenmiştir (41).

HFE gen mutasyonları (C282Y, H63D ve S65C) ile kalıtsal hemokromatozis hastalığı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Diego ve arkadaşları, biyokimyasal ve klinik özellikleri nedeniyle hemokromatozis tanısı almış 83 hasta ve 150 kontrol bireyinde C282Y, H63D ve S65C mutasyonlarını PCR-RFLP yöntemi ile analiz etmişlerdir. Hastaların genotip sıklıkları, % 7 (C282Y/C282Y), % 20 (H63D/H63D), % 10 (C282Y/H63D), % 1 (H63D/S65C), % 22 (H63D/N), % 2 (C282Y/N), % 2 (S65C/N) olarak bulunurken, % 36'sında ise herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir. Hem hasta hem kontrol grubunda heterozigot H63D mutasyon oranının yüksek olduğu gözlenmiştir (78). Hellerbrand ve arkadaşları, Güney Almanya'da 36 kalıtsal hemokromatozis (aralarında akrabalık olmayan) ve 126 kontrol bireyinde C282Y ve H63D mutasyonlarını SSCP temelli kapiller elektroforez (SSCP-CE), RFLP ve PCR-ELISA ile değerlendirmişlerdir. Ayrıca, hastalarla akrabalığı olan 76 bireyde aile taraması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, 26 kalıtsal hemokromatozis hastasının (% 72) C282 mutasyonu açısından homozigot mutant olduğu, 3 hastanın bileşik heterozigot, 1 hastanın ise H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olduğunu gözlemişlerdir. Aile taramasında ise 6 bireyin C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant olduğunu belirlemişlerdir. SSCP-CE, RFLP ve PCR-ELISA yöntemleri ile elde edilen sonuçların aynı olduğu da ortaya konulmuştur (82). Leone ve arkadaşları, Ekvator'da yaptıkları çalışmada 100 sağlıklı bireyde ve 12 hemokromatozis hastasında HFE gen mutasyonlarını (C282Y, H63D ve S65C) PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Analizler sonucunda, Ekvator popülasyonunda alel frekansları % 0.0 (C282Y), % 0.035 (H63D), % 0.04 (S65C) olarak belirlenmiştir. Hemokromatozis hastalarında ise alel frekansları % 0.0 (C282Y), % 0.167 (H63D) ve % 0.042 (S65C) şeklinde hesaplanmıştır. H63D mutasyonu açısından hasta ve kontrol bireyleri arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya konulmuştur (87).

Kalıtsal hemokromatozis hastalığı ile HFE gen mutasyonları arasındaki ilişkiyi belirlemek için Türkiye'de de araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Şimşek ve arkadaşları, beş kalıtsal hemokromatozis hastasında yaptıkları çalışmada C282Y ve H63D mutasyonlarını ve HFE genindeki diğer değişimleri sekans yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Analizler sonucunda, hastaların hepsinin sadece H63D mutasyonu açısından heterozigot taşıyıcı olduğu gözlenmiştir (84).

HFE gen mutasyonlarının, talasemi hastalığı üzerindeki etkisini belirlemek için yapılmış olan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Karimi ve

arkadaşları 43 yenidoğan (HbBart's tanısı almış), 203 sağlıklı erişkin ve kan transfüzyonu almakta olan 154 beta-talasemi major hastasında HFE gen mutasyonlarını (C282Y, H63D ve S65C) araştırmışlardır. Sekans yöntemi ile gerçekleştirilmiş analizler sonucunda, C282Y ve S65C mutasyonu gözlenmezken, H63D mutasyonu alel frekansları yenidoğanlarda % 0.10, sağlıklı erişkinlerde % 0.082, beta-talasemi majorlerde % 0.080 olarak tespit edilmiştir (85). Jazayeri ve arkadaşları, İranlı beta-talasemi minor hastalarında HFE gen mutasyonlarını (C282Y ve H63D) PCR-RFLP yöntemi ile taramışlardır. Çalışma 93 hasta (56 kadın) ve 104 kontrol bireyin (54 kadın) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Onsekiz hasta (% 19.4), 12 kontrol bireyin (% 11.5) H63D mutasyonu için heterozigot; 3 hasta (% 3.2), 3 kontrol (% 2.9) bireyin ise homozigot mutant genotipte oldukları tespit edilmiştir. Hasta grubunda birisi bileşik heterozigot genotipinde olmak üzere 3 C282Y mutasyonu bulunmuştur. H63D alel frekansı hasta grubunda % 12.9, kontrollerde ise % 8.65; C282Y mutasyonu alel frekansları ise hastalarda % 1.61, kontrollerde ise % 0.0 olarak belirlenmiştir. HFE gen mutasyonları açısından, Beta-talasemi minör hastaları ve kontrol bireyleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (86).

Rovetta ve arkadaşları, HFE gen mutasyonları ile romatoid artrit arasındaki ilişkiyi belirlemek için 118 hasta (28'i erkek) üzerinde çalışma gerçekleştirmişlerdir. Analizler sonucunda 53/118 (% 45) hastanın HFE gen mutasyonu için taşıyıcı olduğu belirlenmiştir. HFE gen mutasyonu ile romatoid hastalıklar arasında ilişki olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (90). Cauza ve arkadaşları, HFE gen mutasyonları (C282Y ve H63D) ile artropati arasındaki ilişkiyi belirlemek için 203 hasta üzerinde çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kesilmiş PCR ürünlerini poliakrilamid jel elektroforezinde yürüterek genotipleri belirlemişlerdir. Analizler sonucunda alel frekansları C282Y için % 4.5, H63D mutasyonu için % 12.8 olarak gözlenmiştir. Beş hastanın H63D mutasyonu için, bir hastanın ise C282Y mutasyonu için homozigot mutant olduğu görülmüş ve HFE gen mutasyonlarının araştırılması artrit gelişiminde etkili faktörün belirlenmesinde önemli olduğunu ortaya koymuşlardır (93).

HFE gen mutasyonları ile karaciğer sirozu arasındaki ilişkiyi belirlemek için birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Erhardt ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılmış olan çalışmada 401 kronik hepatit C enfeksiyonu olan hasta ve 295 sağlıklı kontrol bireyi değerlendirilmiş ve araştırmada heterozigot H63D ve C282Y mutasyonlarının karaciğer fibrozisi ve sirozu için bağımsız risk faktörleri olduğunu belirlemişlerdir (22). Lal ve arkadaşları, 2000 yılında C282Y mutasyonu ile hepatit C ile enfekte olmuş olan ve idiyopatik sirozlu hastalarda demir birikimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yirmialtı hepatit C kaynaklı siroz hastasında üç, 22 idiyopatik siroz hastasında ise bir heterozigot C282Y mutasyonu belirlenmiştir. Hastaların karaciğer dokusunun histolojik incelenmesi sonucunda hepatit C ile enfekte olmuş olan hastalarda C282Y mutasyonunun minör düzeyde demir birikimine neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır (10).

HFE gen mutasyonları ile hepatosellüler karsinoma arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılmış olan çalışmalardan birisi 2005 yılında Fracanzani ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışma 303 siroz hastası olan ve daha sonraki yıllarda hepatosellüler karsinoma gelişmiş bireylerde gerçekleştirilmiştir. Hastaların hepatit B, C viral enfeksiyon durumları, HFE gen mutasyonları açısından



genotipleri ve alkol kullanımları analiz edilmiştir. Hepatosellüler karsinoma hastası olan 303 bireyinin 12'sinin (% 4.0) C282Y mutasyonu, 93'ünün (% 30.7) H63D mutasyonu açısından taşıyıcı oldukları belirlenmiştir. Analizler sonucundan C282Y mutasyonu olan erkek hastaların hepatit B viral enfeksiyonu için normal genotipli hastalara göre 3.8 kat, H63D mutasyonu olan kadın hastaların ise hepatit C enfeksiyonu görülme oranı normal genotipli hastalara göre 6 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir (92). Yine Boige ve arkadaşları, C282Y ve H63D mutasyonlarının siroz hastalarında hepatosellüler karsinoma oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma, 133 hepatosellüler karsinomalı siroz hastası ve 100 hepatosellüler karsinoma gelişmemiş siroz hastası üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda mutasyonların hepatosellüler karsinoma gelişimi üzerinde etkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (15).

HFE geniyle diğer kanser tipleri arasında ilişki olup olmadığını belirlemek için de çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Serum demir konsantrasyonundaki yükselmeye bağlı olarak DNA'da oksidatif hasar meydana gelebilmektedir. Dorak ve arkadaşları, HFE gen mutasyonları ile çocukluk çağı akut lenfoblastik lökemia (ALL) arasındaki ilişkiyi göstermek için yaptıkları araştırmada, C282Y mutasyonu ile ALL arasında cinsiyete bağlı bir ilişki olduğunu iki İngiliz popülasyonunda ortaya koymuşlardır. Fakat, erişkin ALL ve Hodgkin hastalığında benzer ilişki belirlenmemiştir. ALL ile HFE gen mutasyonu arasındaki ilişkinin lenfoid hücrelerde demir miktarındaki yükselmeden kaynaklandığı düşünülmektedir (89). Veneri ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmada 82 erişkin akut lösemi hastasında (AML (48 hasta), ALL (34 hasta) kalıtsal hemokromatozis gen mutasyonları (HFE genindeki C282Y, V53M, V59M, H63D, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X ve Q283P, TFR-2 genindeki Y250X) araştırılmıştır. Yirmiyedi hastanın 6'sında heterozigot C282Y, 6'sında homozigot H63D, 13'ünde heterozigot H63D, 2'sinde heterozigot S65C mutasyonu belirlenmiştir. Kalıtsal hemokromatozis gen mutasyonu belirlenmiş hastalar ile gen mutasyonu olmayan hastalar arasında demir miktarı ile ilgili bir korelasyon gözlenmemiştir (91).

Tanımlanabilen etiyolojik faktörlerle ortaya çıkan karaciğer sirozu ile ilgili çok yönlü çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, idiyopatik sirozla ilgili araştırma sayısı oldukça azdır. Bugüne kadar yapılan literatür taramasında dünyada çok az, ülkemizde ise HFE gen mutasyonları ile idiyopatik siroz hastalığı arasındaki ilişkiyi gösteren genetik çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada, idiyopatik sirozlu hastalarda genetik bir faktör olarak HFE gen mutasyonlarının etkili olup olmadığını araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Hasta grubu, siroz oluşumuna neden olduğu bilinen etiyolojik faktörlerin dışlandığı idiyopatik siroz hastalarından oluşturulmuştur. İdiyopatik sirozlu hastalar, Akdeniz Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından gönderilmiştir. Tanı konulan hastalar, siroz etiyolojisinde rol oynayan uzun süreli alkol ve ilaç kullanımı, viral enfeksiyonlar gibi faktörler araştırıldıktan sonra idiyopatik sınıfına dahil edilmişlerdir. Ayrıca, her hastanın ailesel hastalık durumu ile ilgili bilgi alınmış ve DNA onam formu imzalatılmıştır.

Kontrol grubu, kendisinde ve ailesinde demir birikimi ile ilgili herhangi bir hastalık olmayan, rastgele seçilmiş 141 sağlıklı bireyden oluşturulmuştur. Her birey ailesel hastalıklar açısından değerlendirilmiş ve DNA onam formu imzalatılmıştır. Ayrıca, idiyopatik siroz hastalarının ve kontrol bireylerinin serum demir konsantrasyonu, ferritin, toplam demir bağlama kapasitesi Akdeniz Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında ölçülmüştür.

### 3.2. Kullanılan Yöntemler

Çalışmada, periferik kandan DNA izolasyonu, PCR, RFLP, agaroz jel elektroforez yöntemleri ve görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

#### 3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubu bireylerinden, K<sub>3</sub>EDTA'lı steril tüplere (Venoject®) 10 ml periferik kan alındı. Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart DNA izolasyon yöntemi (29) değiştirilerek, kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıda verildiği gibi uygulandı.

##### 3.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler:

###### Lizis Tamponu

155 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma)

10 mM KHCO<sub>3</sub> (Sigma)

1 mM EDTA (Sigma), pH 7.4-8.0

Yukarıda verilen derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan lizis tamponu otoklavda steril edildi ve + 4 °C'de saklandı.

###### WBL (White Blood Lysis) Tamponu

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA, pH 7.4-8.0

Yukarıda verilen derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan WBL tamponu otoklavda steril edildi ve oda ısısında saklandı.

### 9.5 M Amonyum Asetat

36.613 gram amonyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , Merck) 50 ml distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildi ve oda ısısında saklandı.

### % 10 SDS Çözeltisi

Bir (1) gram SDS 10 ml distile suda çözüldü. Filtre ile steril edildi ve oda ısısında saklandı.

### Proteinaz K (20 mg/ml)

100 mg proteinaz K, 5 ml steril suda çözüldü ve  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### %70'lik Etanol

70 ml etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.2.1.2. İşlemler

On ml  $\text{K}_3\text{EDTA}$ 'lı kan alt üst edilerek homojenize edildikten sonra steril 50 ml'lik steril disposable santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 30 ml lizis tamponu eklendi ve vortekste iyice karıştırıldı. Buzda 15-20 dakika bekletildi.  $+4^\circ\text{C}$ 'de 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj (Sigma) edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak iyice homojenize edildikten sonra üzerine 20 ml lizis tamponu eklendi. Tekrar  $+4^\circ\text{C}$ 'de 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı ve çökelti homojenize edildi. Çökeltiye 9.45 ml WBL tamponu, 500  $\mu\text{l}$  % 10'luk SDS, 50  $\mu\text{l}$  proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.  $37^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 16 saat bekletildi. Ertesi gün üzerine 3.7 ml, 9.5 M amonyum asetat çözeltisi eklendi. Beyazımsı bir renk oluşuncaya kadar elle vurularak iyice karıştırıldı. Oda ısısında 30 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Sıvı dökelti fazı steril yeni bir disposable santrifüj tüpü tüpünde toplandı. Toplanan sıvı fazın üzerine saf etanol (% 99) eklendi, alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı. Gözle ayırt edilebilir bir şekilde çökelti oluşturan DNA'lar 500  $\mu\text{l}$  % 70'lik etanol bulunduran 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Oda ısısında 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Çökelti  $37^\circ\text{C}$ 'lik etüvde ağzı açık olarak kurutuldu. Kurutulan DNA steril suda çözüldü. DNA örneklerinin spektrofotometrik yöntemle 260 ve 280 nm'lik dalga boylarında optik dansite ölçümleri gerçekleştirildi. DNA saflık oranları ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) ve DNA konsantrasyonları  $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{SF}$  (Sulandırma Faktörü) formülü ile belirlendi. Elde edilen DNA örnekleri uzun süre saklanacaksa  $-20^\circ\text{C}$ 'de, kısa sürede kullanılacaksa  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.2.2. PCR Yöntemi

PCR reaksiyonu, Genius (Techne, UK) markalı thermal cyclerda gerçekleştirildi.

#### PCR programları:

95 $^\circ\text{C}$	10 dakika (başlangıç denaturasyonu) 1 döngü	
95 $^\circ\text{C}$	1 dakika (denaturasyon)	} 35 döngü
55 $^\circ\text{C}$	1 dakika (birleşme)	
72 $^\circ\text{C}$	1 dakika (uzama)	
72 $^\circ\text{C}$	10 dakika (son uzama)	1 döngü

<b>PCR içeriği</b>	<b>Miktar</b>
dNTP karışımı (100 mM)	0.8 µl
10x PCR reaksiyon tamponu	5.0 µl
İleri primer (20 pmol/µl)	0.8 µl
Geri primer (20 pmol/µl)	0.8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4.0 µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH <sub>2</sub> O	36.4 µl
<u>Genomik DNA (250 ng/µl)</u>	<u>2.0 µl</u>
Toplam	50.0 µl

Çalışmamızda C282Y, H63D, S65C mutasyonları için Roche marka primerler kullanılmıştır. S65C ve H63D mutasyonları için aynı primer çiftleri kullanıldı.

**C282Y mutasyonu için kullanılan primerler:**

İleri primer: 5'-Tgg CAA ggg TAA ACA gAT CC-3'

Geri primer: 5'-CTC Agg CAC TCC TCT CAA CC-3'

**H63D ve S65C mutasyonları için kullanılan primerler:**

İleri primer: 5'-ACA Tgg TTA Agg CCT gTT gC-3'

Geri primer: 5'-gCC ACA TCT ggC TTg AAA TT-3'

**3.2.3. RFLP Yöntemi**

Yukarıda belirtilen PCR programı ile çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin restriksiyon enzim kesimleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

**C282Y mutasyonu için restriksiyon enzim kesim içeriği:**

10x tampon (L)	2.5 µl
Rsa I (10 U/µl)	0.2 µl
PCR ürünü	7.0 µl
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>15.3 µl</u>
Toplam	25.0 µl

**H63D mutasyonu için restriksiyon enzim kesim içeriği:**

2x tampon (H)	12.5 µl
Mbo I (Nde II) (5 U/µl)	0.4 µl
PCR ürünü	7.0 µl
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>5.1 µl</u>
Toplam	25.0 µl

**S65C mutasyonu için restriksiyon enzim kesim içeriği:**

10x tampon (H)	2.5 µl
Hinf I (10 U/µl)	0.2 µl
PCR ürünü	7.0 µl
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>15.3 µl</u>
Toplam	25.0 µl

Restriksiyon enzim kesimi için gerekli maddeler 0.2 veya 0.5 ml'lik ependorfa konulduktan sonra 37 °C su banyosunda 16 saat bekletildi Restriksiyon enzim kesimi gerçekleşmiş olan kesim ürünleri % 3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek her bir mutasyon için genotip belirlendi.

### **3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi**

#### **%3'lük agaroz jelin hazırlanması:**

- 1) 1.5 gram agaroz tartılarak 50 ml 1X TBE'de çözüldü.
- 2) 50-55 °C'ye soğutulduktan sonra, 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi
- 3) Elektroforez küvetine tarak yerleştirildi ve üzerine sızıntı olmayacak şekilde agaroz jel döküldü, oda ısısında polimerize olması için bekletildi.
- 4) Tarak dikkatlice uzaklaştırıldı ve agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirildi.

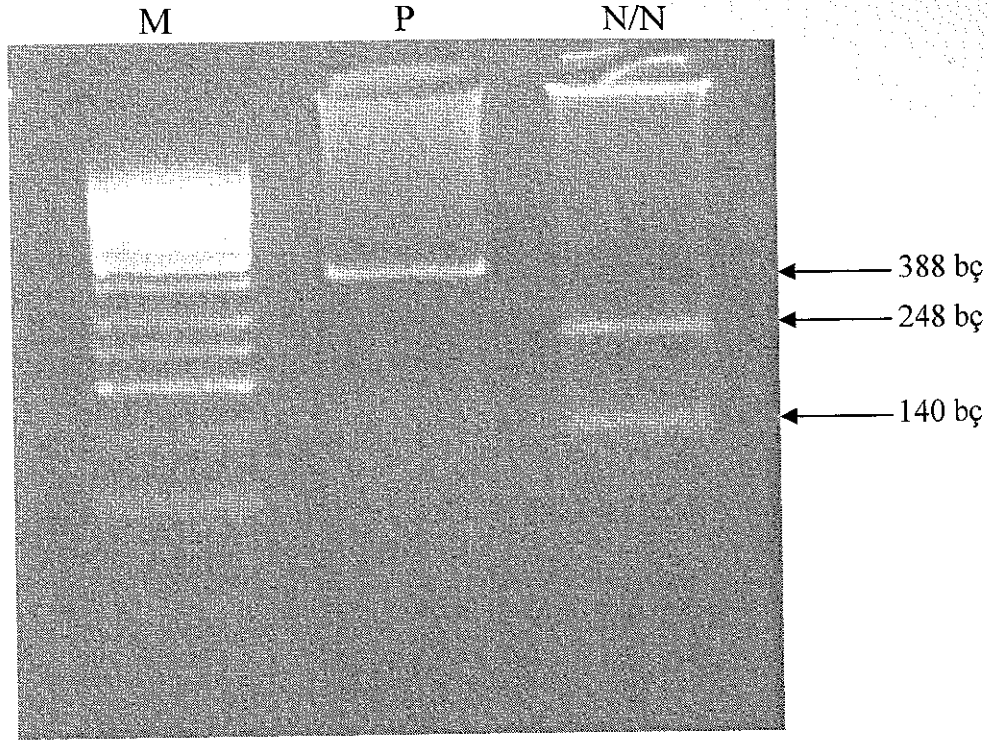
%3'lük agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü, restriksiyon enzim kesim ürünü ve 50 bç'lik marker (Roche) yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı (Biolab) ile 80 voltta 30 dakika örnekler yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi. Transilluminatöre (Herolab) bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraflar alındı.

## BULGULAR

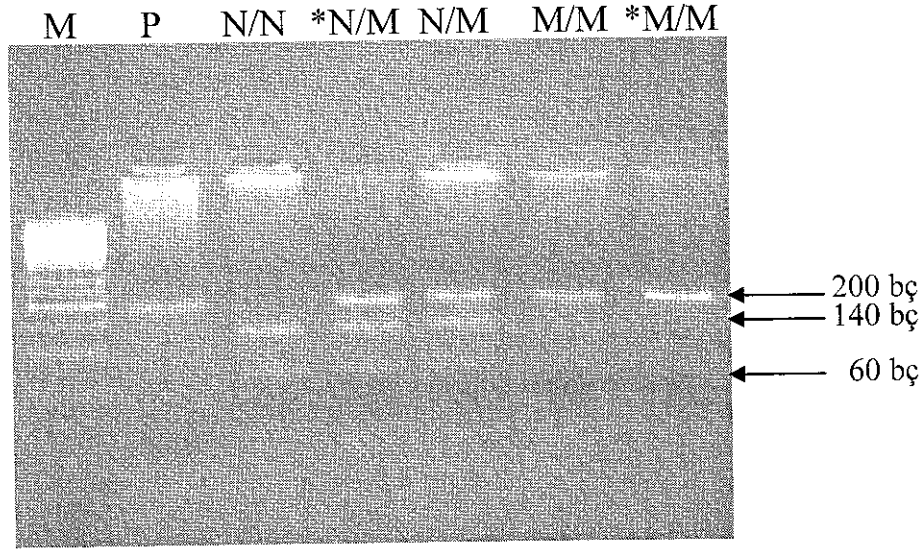
Çalışma, Akdeniz Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalından gönderilen idiyopatik siroz tanısı almış 16 hasta ve rastgele seçilmiş 141 sağlıklı kontrol bireyinde gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden DNA izolasyonu yapıldı, idiyopatik siroz hastalarının DNA verileri Çizelge 4.1.'de görülmektedir. HFE gen mutasyonları, PCR-RFLP tekniğiyle analiz edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. İdiyopatik siroz hastalarının DNA verileri

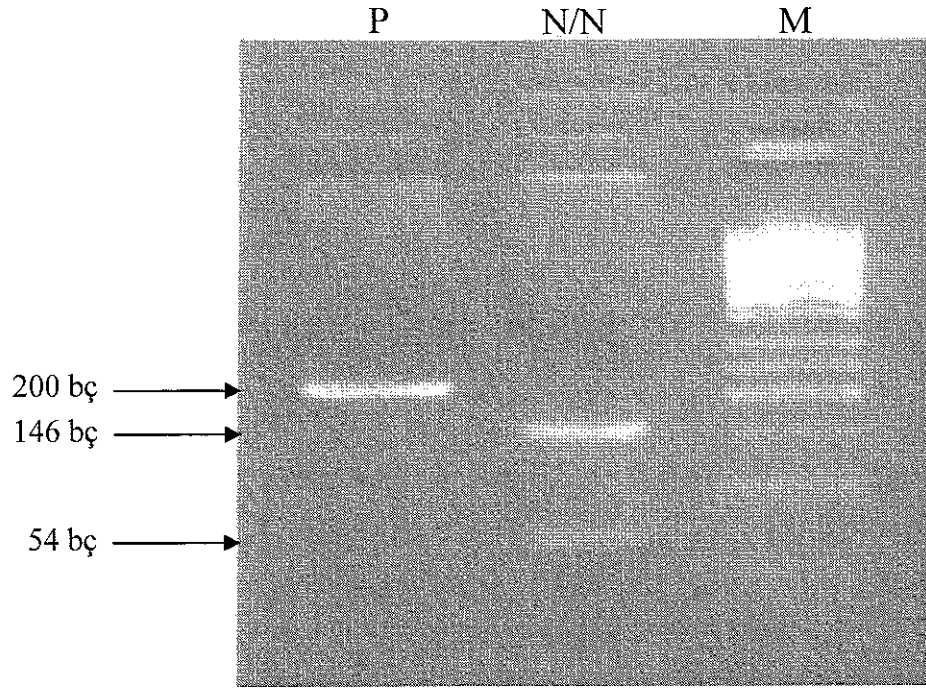
Hasta No	OD260	OD280	OD260/ OD280	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)
1.	0.054	0.029	1.86	540
2.	0.083	0.044	1.88	830
3.	0.035	0.019	1.84	350
4.	0.042	0.026	1.62	420
5.	0.083	0.056	1.48	830
6.	0.060	0.037	1.62	600
7.	0.016	0.080	2.0	160
8.	0.194	0.104	1.86	1940
9.	0.037	0.019	1.95	370
10.	0.014	0.070	2.0	140
11.	0.162	0.085	1.90	1620
12.	0.056	0.028	2.00	560
13.	0.159	0.080	1.98	1590
14.	0.053	0.027	1.96	530
15.	0.086	0.050	1.72	860
16.	0.039	0.026	1.50	390



**Şekil 4.1.** % 3'lük agaroz jelde C282Y mutasyonu için PCR ürünü ve Rsa I restriksiyon enzim kesim profili. M: 50 bç'lik marker, P: PCR ürünü, N/N: Normal genotip.



**Şekil 4.2.** % 3'lük agaroz jelde H63D mutasyonu için PCR ürünü ve Mbo I (Nde II) restriksiyon enzim kesim profili M: 50 bç'lik marker, P: PCR ürünü, N/N: Normal genotip, \*N/M: Heterozigot taşıyıcı idiyopatik siroz hastası, N/M: heterozigot kontrol bireyi, M/M: Homozigot mutant kontrol bireyi, \*M/M: homozigot mutant idiyopatik siroz hastası



**Şekil 4.3.** % 3'lük agaroz jelde S65C mutasyonu için PCR ürünü ve Hinf I restriksiyon enzim kesim profili. M: 50 bç'lik marker, P: PCR ürünü, N/N: Normal genotip.

Hastaların idiyopatik siroz tanısının konduğu zamanki yaşları ve C282Y, H63D, S65C mutasyonları Çizelge 4.2'de verilmektedir. Analiz sonucunda 16 idiyopatik siroz hastasında bir heterozigot (hasta no: 9) ve bir homozigot H63D mutasyonu (hasta no: 16) gözlenirken, C282Y ve S65C mutasyonları hiçbir hastada bulunmamıştır (Çizelge 4.2)

Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 141 bireyin 30'unda H63D mutasyonu heterozigot, iki bireyde ise aynı mutasyon homozigot olarak belirlenmiştir. Hiçbir kontrol bireyinde, hasta grubunda olduğu gibi, C282Y ve S65C mutasyonları gözlenmemiştir (Çizelge 4.3). H63D mutasyonu alel frekansı kontrol bireylerinde % 12.06, hasta grubunda ise % 9.38 olarak hesaplanmıştır. Heterozigot genotipli hasta ve kontrol bireylerinin frekansları sırasıyla % 6.25, % 21.28 olarak bulunurken, homozigot mutant hastaların frekansı % 6.25, kontrol bireylerin ise % 1.42 olduğu belirlenmiştir.



Çizelge 4.2. İdiyopatik siroz hastalarının tanı yaşları ve HFE gen mutasyon sonuçları

Hasta No	Tanı Yaşı	C282Y	H63D	S65C
1.	57	N/N	N/N	N/N
2.	72	N/N	N/N	N/N
3.	60	N/N	N/N	N/N
4.	19	N/N	N/N	N/N
5.	47	N/N	N/N	N/N
6.	69	N/N	N/N	N/N
7.	49	N/N	N/N	N/N
8.	72	N/N	N/N	N/N
9.	66	N/N	N/M	N/N
10.	24	N/N	N/N	N/N
11.	58	N/N	N/N	N/N
12.	61	N/N	N/N	N/N
13.	29	N/N	N/N	N/N
14.	37	N/N	N/N	N/N
15.	24	N/N	N/N	N/N
16.	53	N/N	M/M	N/N

N/N: Normal genotip, N/M: Heterozigot taşıyıcı, M/M: Homozigot mutant.

Çizelge 4.3: Kontrol grubunda HFE gen mutasyonlarının dağılımı

Mutasyon tipi	H63D			S65C			C282Y		
	N/N	N/M	M/M	N/N	N/M	M/M	N/N	N/M	M/M
Genotip	N/N	N/M	M/M	N/N	N/M	M/M	N/N	N/M	M/M
Birey sayısı	109	30	2	141	0	0	141	0	0

İdiyopatik siroz hastaları ve kontrol bireyleri yaş aralıkları, cinsiyet dağılımı ve ortalama biyokimyasal demir parametreleri açısından karşılaştırılmıştır. Kan demir parametrelerinden transferin doygunluğu ve ferritin düzeylerinin hasta grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir. Serum demir konsantrasyonu ve toplam demir bağlama kapasitesi ise kontrol bireylerinde daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. İdiyopatik siroz hastalarının yaş aralığı 19-72 arasında, kontrol bireylerinin ise 17-51 arasında değişmektedir. Cinsiyet dağılımına bakıldığında idiyopatik siroz hastalarının % 50'si kadın, % 50'si erkek; kontrol bireylerinin ise % 65.75'i kadın, % 34.25'i erkek cinsiyette olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** Hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet ve ortalama biyokimyasal demir parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	İdiyopatik siroz hastaları	Kontrol grubu
Yaş aralığı (yıl)	19-72	17-51
Cinsiyet	8 K, 8 E	92 K, 49 E
Ferritin	89.49 ng/ml	37.10 ng/ml
Serum demir konsantrasyonu	84.67 µg/dl	94.75 µg/dl
Toplam demir bağlama kapasitesi	266.87 µg/dl	343.75 µg/dl
Transferin doygunluğu	% 40.82	% 27.56

İdiyopatik siroz hastalarının ferritin, transferin doygunluğu, toplam demir bağlama kapasitesi ve serum demir konsantrasyon değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. İdiyopatik siroz hastalarının biyokimyasal demir düzeyleri heterojenite göstermektedir. Ferritin değeri sağlıklı bir kadında 13 ile 150 ng/ml, sağlıklı bir erkek bireyde ise 30 ile 400 ng/ml arasındadır. İdiyopatik siroz hastalarının ferritin değerlerine bakıldığında kadın bireylerden sadece hasta no 2'de (260.20 ng/ml) yüksek, hasta no 7, 9, 10 ve 13'te ise düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Erkek bireylerde, normal değerlerin üzerinde hasta görülmemiş olup, sadece hasta no 5'te normal değerden düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Serum demir konsantrasyonu normal değeri; kadınlarda 37-145 µg/dl, erkeklerde ise 59-158 µg/dl arasındadır. Serum demir konsantrasyonu, kadın hastalardan hasta no 7, 9, 10, 13'te düşük düzeyde, hasta no 2 ve 11'de ise yüksek miktarda olduğu gözlenmiştir. Erkek hastalardan, hasta no 3 ve 16'da normal düzeyin üzerinde, hasta no 4, 8 ve 14'de ise altında olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5).

Sağlıklı kadın ve erkek bireylerde, 228 ile 428 µg/dl arasında olması beklenen toplam demir bağlama kapasitesi, serum demir konsantrasyonu ve ferritin düzeyi

düşük olan hasta no 7 ve 13'te normal miktarın üzerinde bulunmuştur. Üç idiyopatik sirozlu kadın hastada (hasta no: 2, 6, 11) ve beş erkek hastada (hasta no: 1, 3, 4, 8, 16) ise 228 µg/dl'nin altında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. İdiyopatik siroz hastalarının cinsiyet dağılımı ve demir parametreleri.

Hasta No/ Cinsiyet	Ferritin (ng/ml)	Serum demir konsantrasyonu (µg/dl)	Toplam demir bağlama kapasitesi (µg/dl)	Transferin doygunluğu (%)
1. (E)	60.90	92.00	205.00	44.88
2. (K)	260.20	195.00	184.00	105.98
3. (E)	303.30	172.00	194.00	88.66
4. (E)	143.00	43.00	226.00	19.03
5. (E)	27.08	60.00	313.00	19.17
6. (K)	25.80	84.00	189.00	44.45
7. (K)	6.43	29.00	433.00	07.70
8. (E)	133.70	37.00	180.00	20.56
9. (K)	4.76	31.00	312.00	09.94
10. (K)	5.70	30.00	351.00	08.55
11. (K)	61.94	168.00	200.00	84.00
12*. (E)	-	-	-	-
13. (K)	6.79	21.00	436.00	04.82
14. (E)	37.00	28.00	333.00	8.41
15. (K)	106.10	110.00	271.00	40.59
16. (E)	159.60	170.00	176.00	96.60

12\* nolu hastanın kan demir parametreleri elde edilemediğinden ortalama değerler 15 hasta üzerinden hesaplanmıştır.

Serum demir konsantrasyonunun toplam demir bağlama kapasitesine oranının 100 ile çarpılması sonucunda bulunan transferin doygunluk değeri, vücuttaki demir

düzeyi ile ilgili bilgi veren önemli biyokimyasal parametrelerden birisidir. Normal transferin doygunluk değeri % 25-45 olarak kabul edilmektedir. Hasta grubunun transferin doygunluk değeri % 4.82 ile % 105.98 arasında değişmektedir. Transferin doygunluğu iki kadın (hasta no: 2, 11) ve iki erkek hastada (hasta no: 3, 16) normal düzeyin üzerinde belirlenmiştir. Transferin doygunluk değeri < % 25 olan 4 kadın (hasta no: 7, 9, 10, 13) ve 4 erkek hasta (hasta no: 4, 5, 8, 14) gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Heterozigot H63D mutasyonu taşıyan idiyopatik siroz hastasının (hasta no: 9) ferritin (4.76 ng/ml), serum demir konsantrasyonu (31.00 µg/dl) ve transferin doygunluk değerleri (% 09.94) normal düzeyin altında, toplam demir bağlama kapasitesi (312.00 µg/dl) ise normal sınırlar arasında olduğu bulunmuştur. Aynı mutasyon açısından homozigot mutant olduğu belirlenmiş idiyopatik siroz hastasının (hasta no: 16) biyokimyasal demir parametrelerinden ferritinin 159.60 ng/ml, serum demir konsantrasyonunun 170.00 µg/dl, toplam demir bağlama kapasitesinin 176.00 µg/dl ve transferin doygunluk değerinin ise % 96.60 olduğu görülmüştür. Hastanın transferin doygunluk değeri ve serum demir konsantrasyonu normal sınırların üzerinde bulunurken; ferritin değeri normal aralıkta, toplam demir bağlama kapasitesi ise düşük düzeydedir (Çizelge 4.5).

Sağlıklı 141 kontrol grubu bireyinin, H63D mutasyon genotipine göre biyokimyasal demir düzeylerinin ortalamaları hesaplanmıştır. Normal genotipli olan bireylerde ortalama ferritin (27.24 ng/ml), serum demir konsantrasyonu (84.20 µg/dl), toplam demir bağlama kapasitesi (342.4 µg/dl) ve transferin doygunluk düzeylerinin (% 24.59) normal değerlerde olduğu gözlenmiştir. H63D mutasyonu açısından heterozigot taşıyıcı olan bireylerde ortalama ferritin (15.73 ng/ml) ve transferin doygunluk düzeyleri (% 19.12) düşük, toplam demir bağlama kapasitesi (384.50 µg/dl) ve serum demir konsantrasyonunun (73.50 µg/dl) ise normal değerlerde olduğu belirlenmiştir. H63D mutasyon analizinde homozigot mutant olduğu gözlenmiş olan iki kontrol bireyinin ortalama serum demir konsantrasyonu (190 µg/dl) ve transferin doygunluk değerleri (% 55.95) normal düzeyin üzerinde bulunmuştur. Fakat, toplam demir bağlama kapasitesi (269 µg/dl) ve ferritin miktarlarının (150.50 ng/ml) ise normal değerde oldukları görülmüştür. Homozigot mutant genotipdeki iki kontrol bireyin toplam demir bağlama kapasitesi dışındaki diğer biyokimyasal demir parametrelerinin normal ve heterozigot genotipindeki bireylere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

HFE gen mutasyonları ile biyokimyasal demir düzeyleri karşılaştırıldığında H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olan bir hasta ve iki kontrol bireyinde ferritin, serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluğunun normal ve heterozigot genotipli hasta ve kontrol bireylerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7.).

**Çizelge 4.6.** H63D mutasyon genotipine göre kontrol grubu bireylerinin ortalama demir parametreleri.

Kan demir parametreleri	Genotipler		
	N/N (n=109)	N/H63D (n=30)	H63D/H63D (n=2)
Ferritin (ng/ml)	27.24	15.73	150.50
Serum demir konsantrasyonu (µg/dl)	84.20	73.50	190.00
Toplam demir bağlama kapasitesi (µg/dl)	342.4	384.50	269.00
Transferin doygunluğu (%)	24.59	19.12	55.95

**Çizelge 4.7.** H63D mutasyonu açısından idiyopatik siroz hastaları ve kontrol bireylerinin biyokimyasal demir parametrelerinin karşılaştırılması

Kan Demir Parametreleri	İdiyopatik Siroz Hastalarının Genotipleri			Kontrol Bireylerinin genotipleri		
	N/N (n=14)	N/H63D (n=1)	H63D/H63D (n=1)	N/N (n=109)	N/H63D (n=30)	H63D/ H63D (n=2)
Ferritin (ng/ml)	94.08	4.76	159.60	27.24	15.73	150.50
Serum demir konsantrasyonu (µg/dl)	84.64	31.00	170.00	84.20	73.50	190.00
Toplam demir bağlama kapasitesi (µg/dl)	264.64	312.00	176.00	342.40	384.50	269.00
Transferin doygunluğu (%)	31.98	9.94	96.60	24.59	19.12	55.95

N/N: Normal genotip, N/H63D: Heterozigot taşıyıcı, H63D/H63D: Homozigot mutant

Demir metabolizmasında epidemiyolojik faktörler de rol oynamaktadır. Epidemiyolojik faktörlerden olan yaş ve cinsiyet vücutta demir birikimi üzerinde etkili olabilmektedirler. Çalışmada yer alan idiyopatik siroz hastaları ve rastgele seçilmiş olan kontrol bireylerinin cinsiyete bağlı olarak biyokimyasal demir değerleri ve H63D mutasyon dağılımı Çizelge 4.8'de verilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda bulunan kadın bireylerin serum demir konsantrasyonu, transferin doygunluğu ve ferritin değerlerinin erkek bireylere göre daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

Fakat, toplam demir bağlama kapasitesinin kadınlarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. H63D mutasyon dağılımı ise erkek ve kadın hastalarda eşit oranda görülürken, kontrol grubunda ise kadın bireylerin fazlalığı nedeniyle bu mutasyonun bu cinsiyette daha sık olduğu gözlenmiştir.

**Çizelge 4.8.** Hasta ve kontrol grubunda cinsiyete bağlı biyokimyasal demir parametrelerinin ve H63D mutasyonu açısından genotiplerin dağılımı.

Parametreler	Hasta Grubu		Kontrol Grubu	
	Erkek (n=8)	Kadın (n=8)	Erkek (n=49)	Kadın (n=92)
Ferritin (ng/ml)	123.51	59.72	58.32	36.95
Serum demir konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	86.00	83.50	149.50	90.00
Toplam demir bağlama kapasitesi ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	232.43	291.63	321.50	343.72
Transferin doygunluğu (%)	37.00	28.63	46.50	26.18
N/N	7	7	38	71
N/H63D	0	1	11	19
H63D/H63D	1	0	0	2

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İdiyopatik sirozlu 16 hasta ve sağlıklı 141 kontrol bireyinde gerçekleştirilen çalışmada, HFE gen mutasyonları (C282Y, H63D ve S65C)'nin analiz sonucu hasta grubunda bir ve kontrol grubunda 30 heterozigot H63D mutasyonu belirlenirken, bir hasta ve iki kontrol bireyinde homozigot H63D mutasyonu olduğu gözlenmiştir. C282Y ve S65C mutasyonları ise hiçbir hasta ve kontrol bireyde belirlenmemiştir.

HFE gen mutasyonları ile idiyopatik siroz arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (10, 16, 39). Yapılan literatür taramalarında bu konuyla ilgili olarak Türkiye'de gerçekleştirilmiş bir araştırmaya rastlanmamıştır. Siroz hastalarının % 5-30'nu oluşturan idiyopatik sirozlu hasta sayısı her geçen gün artmaktadır. Hastalığın etiolojisini belirlemek için farklı genetik faktörler araştırılmıştır. Genetik faktörlerden birisi olduğu düşünülen HFE gen mutasyonları ile ilgili yapmış olduğumuz araştırmada hasta sayısı az olmasına rağmen H63D mutasyonu alel frekansının % 9.38 olduğu bulunmuştur. Bu mutasyon açısından homozigot mutant olan bir hasta ve iki sağlıklı kontrol bireyin biyokimyasal demir parametreleri (ferritin, serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluk değeri), heterozigot ve normal genotipteki bireylere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Vücuttaki demir miktarı ile ilgili bilgi veren önemli parametrelerden birisi olan transferin doygunluk değerinin H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olan idiyopatik siroz hastasında % 96.60 ve iki kontrol bireyinde ise, sağlıklı bir bireyde % 25-45 arasında olması beklenirken, ortalama % 55.95 olarak bulunmuştur. Kan demir parametreleri diyet, demir metabolizmasında görev alan çeşitli genlerin (DMT-1, ferroportin 1, hephestin, transferin, transferin reseptör 1, hepsidin, transferin reseptör 2) ekspresyon düzeylerine, kan yapım ve yıkım hızına, kan kaybına, makrofajların aktivitesine ve enfeksiyon gibi faktörlere bağlı olmasına rağmen, H63D mutasyonu ile vücuttaki demir düzeyinin yükselmesi arasındaki ilişkiden dolayı gerek idiyopatik sirozlu hastalarda, gerekse normal populasyonda H63D ve diğer HFE gen mutasyonlarının taranma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyon, HFE proteini ile transferin reseptör 1 arasındaki etkileşimi azaltmakta ve demir emilim düzeyinin yükselmesine neden olmaktadır (5, 11, 12, 39). Çalışmada, H63D mutasyonu için homozigot mutant bulunan bireylerin demir değerlerindeki yükselmenin bu mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Hasta ve kontrol grubu bireylerin H63D mutasyon genotipleri ile demir parametreleri karşılaştırıldığında homozigot mutant olan bireylerin ferritin, serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluk düzeyleri heterozigot veya normal genotipli olan bireylerden yüksek bulunmasına rağmen, HFE gen mutasyonları açısından normal genotipli bazı hastaların demir değerlerinin farklı olduğu görülmektedir. Hasta no 2, 3 ve 11'in serum demir konsantrasyonlarının 145 µg/dl'nin, transferin doygunluk düzeylerinin ise > % 45'in üzerinde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5). Bu hastaların demir miktarının diğer hastalardan yüksek olmasının nedeni demir emilimi ve depolanmasında görevli proteinlerin üretimine, aktivitesine ve diğer

çevresel faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Demir düzeylerinin yükselmesinde HFE genindeki C282Y, H63D ve S65C mutasyonların dışındaki diğer değişimler de etkili olabilmektedir. Bu üç hastadan sadece hasta no 2'nin ferritin düzeyinin 150 ng/ml'nin üstünde (260.20 ng/ml) olması diğer hastalarda (hasta no: 3 ve 11) çevresel faktörlerin etkin rol oynamış olabileceğini düşündürmektedir. Ferritin molekülü karaciğer hücreleri tarafından eksprese edilmekte ve demirin çeşitli hücrelerde depolanmasında görev almaktadır. Bu molekülün serum konsantrasyonu enfeksiyon ve beslenme gibi etkenlere bağlı olarak hızlı bir değişim göstermemektedir. Hasta no 7, 9, 10, 13'ün ferritin ve transferin doygunluk değerlerinin sırasıyla 37 µg/dl ve < % 25'den düşük olduğu gözlenmiştir. Beş hastanın 4'ünün kadın olması, bu düşüşte kadınlara özgü olan fizyolojik mekanizmalar, beslenme, sekonder hastalıklar ve farklı genetik değişimlerin etkili olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, siroz komplikasyonlarından olan özofagus ve gastrointestinal bölgelerdeki kanama miktarlarındaki farklılıkların da hastaların demir düzeylerinde heterojeniteye neden olabileceği düşünülmelidir.

H63D mutasyonu için heterozigot taşıyıcı olan hasta ve kontrol bireylerin toplam demir bağlama kapasitesi dışındaki demir parametrelerinin normal genotipli bireylerden düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7). H63D varyantının bulunması, başka sebeplerden dolayı demir miktarı düşük olan hasta ve kontrol bireyleri için bir avantaj olarak görülmektedir. Bu değişimin demir eksikliğine bağlı olarak gelişen anemi riskini azaltabileceği düşünülmektedir.

Onaltı idiyopatik siroz hastasında, HFE gen mutasyonlarından C282Y ve S65C mutasyonları gözlenmemiştir. Siroz hastalarında C282Y mutasyonu ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda C282Y mutasyonu açısından homozigot mutant olanlarda biyokimyasal demir düzeylerinin ve karaciğer biyopsisi yapılan hastalarda ise karaciğer dokusundaki demir miktarının normal genotipli kontrol bireylerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (25, 63, 65). Lal ve arkadaşları 26 hepatit C kaynaklı siroz ve 22 idiyopatik siroz hastasında C282Y mutasyon taraması gerçekleştirmişlerdir. Hepatit C kaynaklı siroz hastalarında üç, idiyopatik sirozlu hastalarda ise bir heterozigot C282Y mutasyonu belirlemişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda C282Y mutasyonunun hepatit C kaynaklı siroz hastalarındaki demir birikiminde minör düzeyde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. İdiyopatik siroz hastalarında ise C282Y mutasyonu için anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır (10). S65C mutasyonu, demir emilimi ve birikimi üzerinde minör düzeyde etkilidir. Bu mutasyon, C282Y ve H63D mutasyonu belirlenmemiş kalıtsal hemokromatozis hastalarının yaklaşık % 7'sinde gözlenmiştir (39). S65C varyantı ile idiyopatik siroz arasındaki ilişkiyi belirlemek için gerçekleştirilmiş herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda demir düzeyi yüksek olan hasta ve kontrol bireylerinde C282Y ve S65C mutasyonlarının belirlenmemesi, bu iki mutasyonun bizim popülasyonumuzda nadir görülen mutasyonlar olabileceğini göstermektedir.

Demir metabolizmasında genetik faktörlerin dışında epidemiyolojik etkenlerde rol oynamaktadır. Vücuttaki demir birikimi üzerinde etkili olan epidemiyolojik faktörler arasında yaş ve cinsiyette yer almaktadır. Yaş ile demir birikimi arasında doğru orantılı bir korelasyon olduğu bildirilmektedir. Çalışmada yer alan idiyopatik siroz hastalarının yaş aralıkları 19 ile 72 arasında değişirken,



kontrol bireylerinin yaş aralıkları ise 17 ile 51 arasında değişmektedir (Çizelge 4.4). H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olan hastanın (hasta no: 16) klinik tanısı 53 yaşında, aynı mutasyon açısından heterozigot taşıyıcı olan hastanın (hasta no: 9) ise 66 yaşında konmuştur (Çizelge 4.1). Heterozigot taşıyıcı olan kontrol bireylerinin yaş ortalaması 26, homozigot mutant olan bireylerin ise 30 olduğu görülmüştür. Kontrol grubu bireylerinin yaş ortalamasının hasta grubundan düşük olması, yaşa bağlı olarak demir alım ve birikiminin artabileceğini göstermektedir. Bu mutasyonun sağlıklı bireylerde bulunup bulunmadığının araştırılması genetik danışma verilmesi açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz. Bu artışa bağlı olarak karaciğer dokusunda fazla demir depolanması doku hasarına ve sonuçta çeşitli tipteki karaciğer hastalıklarının gelişimine neden olabilecektir. Heterozigot taşıyıcı olan hasta bireyin demir parametrelerinden ferritin, serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluk değerlerinin normal değerden düşük olmasının beslenme, siroz hastalarının komplikasyonlarından olan varis kanamaları ve demir emilim mekanizmasında görevli diğer genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimlere bağlı ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Homozigot mutant olan idiyopatik siroz hastasının (hasta no: 16) serum demir konsantrasyonu ve transferin doygunluk değerlerinin normal oranların üstünde olmasına rağmen siroz komplikasyonları nedeniyle gerçekleşmiş olan kan kayıplarının demir değerlerinin yükselmesini engellemiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, diğer çevresel ve genetik faktörlerinde etkisinin olabileceği unutulmamalıdır.

Vücutta demir birikimi üzerinde etkili olduğu bilinen faktörlerden birisi de cinsiyettir. Kadınlar, menstrual sıklusa ve hamileliğe bağlı olarak belli periyotlarda kan kaybedebilmekte ve kan kaybına bağlı olarak, demir atılımı gerçekleşmektedir. Erkek bireylerde ise böyle bir fizyolojik mekanizma bulunmadığı için demir atılımı sadece intestinal sistem ve terleme yoluyla gerçekleşmektedir. Bu durumda vücudun ihtiyacından fazla emilen demir başta karaciğer olmak üzere birçok organda birikmektedir. Araştırmamızdaki cinsiyet dağılımına baktığımızda hasta bireylerin % 50'sinin kadın, % 50'sinin ise erkek olduğu görülmektedir. Kontrol bireylerinin % 65.25'i kadın, % 34.75'i ise erkektir. H63D mutasyonu açısından homozigot mutant olan kontrol bireylerinin 20 ve 39 yaşlarında kadın olmaları, menstrual sıklusa bağlı olarak demir kaybının olabileceğini göstermektedir. Fizyolojik mekanizmaya bağlı olarak demir atılımının, H63D mutasyonu penetransını azaltabileceği düşünülmektedir. H63D/H63D genotipli erkek idiyopatik siroz hastasının ferritin ve transferin doygunluk oranlarının, homozigot mutant kontrol bireylerinkinden yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum H63D'nin yaşa bağlı etkisiyle açıklanabilir. Ayrıca, H63D mutasyonu açısından taşıyıcı olan kadın hastanın ve kadın kontrol bireylerinin biyokimyasal demir parametrelerinin düşük bulunmasının cinsiyet kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.8).

Bu çalışma, HFE gen mutasyonlarının idiyopatik siroz etiolojisindeki etkisini belirlemesi yanında, sağlıklı 141 kontrol bireyde HFE gen mutasyonlarının sıklığı konusunda da bilgi verici olmuştur. C282Y ve S65C mutasyonları hiçbir sağlıklı bireyde belirlenemezken, 30 bireyde heterozigot, iki bireyde ise homozigot H63D mutasyonu gözlenmiştir. H63D mutasyonu alel sıklığı çalışmamızda % 12.06 olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde, Barut ve arkadaşlarının 4633 (3827 erkek ve 806 kadın) sağlıklı erişkinde yaptıkları çalışmada, transferin doygunluk ölçümleri  $\geq$  % 50 olan

26 bireyde C282Y ve H63D HFE gen mutasyonlarını araştırmışlardır. Onbir bireyin H63D mutasyonu açısından heterozigot, bir bireyin ise homozigot mutant olduğunu ortaya koymuşlardır. Heterozigot bireylerden birisinin serum ferritin düzeyi 645 ng/ml ve karaciğer dokusunda demir birikimi olduğu gözlenmiştir (32). Bozkaya ve arkadaşları, demir bağlama kapasitesi  $< 28 \mu\text{M}$  olan 3060 gönüllü kan veren bireyin 5'inde C282Y ve H63D HFE gen mutasyon analizi gerçekleştirmişler, beş bireyin ikisinde, heterozigot H63D mutasyonu bulmuşlardır. Ayrıca, bir gecelik açlık döneminden sonra demir bağlama kapasitesi normal bulunan 65 bireyin 7'sinde (% 11.6) heterozigot H63D mutasyonu gözlemişlerdir (40). Şimşek ve arkadaşları 2677 gönüllü kan veren, transferin doygunluk değeri  $\geq \% 45$  olan 265 birey ile transferin doygunluğu  $< \% 45$  olan 57 kontrol bireyde C282Y ve H63D HFE gen mutasyonlarını, ferritin ve ALT düzeylerini araştırmışlardır. Analizler sonucunda C282Y mutasyonu hiçbir bireyde görülmezken, H63D mutasyonu alel frekansları çalışma grubunda % 27.32, kontrol grubunda ise % 21.05 olarak bulunmuştur (41). Bozkaya, Şimşek, Barut ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş üç araştırmada HFE gen mutasyon analizi yapılan bireyler biyokimyasal demir parametrelerine göre seçilmişlerdir. Bu nedenle bu çalışmalar HFE gen mutasyonlarının sağlıklı popülasyondaki sıklığını yansıtmamaktadır. Buna karşılık çalışmamızda, popülasyonu temsil eden rastgele seçilmiş sağlıklı bireyler HFE geninin üç mutasyonu (C282Y, S65C, H63D) için taranmıştır. Bu nedenle, bizim verilerimizin HFE geninin bu üç mutasyon için gerçek veriler olduğu düşüncesindeyiz. Bozkaya ve arkadaşları, heterozigot taşıyıcı sıklığını % 11.6, Şimşek ve arkadaşları ise H63D alel frekansını % 21.05 olarak hesaplamışlardır. Araştırmamızda ise sağlıklı kontrol bireylerinde H63D mutasyonu için heterozigotların sıklığı % 21.28 bulunurken, alel frekansı ise % 12.06 olarak belirlenmiştir. Bizim ve üç araştırmanın oranları karşılaştırıldığında, toplumumuzda C282Y ve S65C'nin görülmediği veya nadir görülebileceği, H63D mutasyon sıklığının ise yüksek olduğu görülmektedir.

Ülkemize coğrafik olarak yakın ve uzak olan topluluklarda da C282Y, H63D ve S65C mutasyonlarının sıklığıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Örneğin, Yunanistan popülasyonunda 264 sağlıklı bireylerde gerçekleştirilmiş HFE gen mutasyonu taramalarında C282Y mutasyonu belirlenmemiştir (75). Yapmış olduğumuz 141 sağlıklı kontrol bireyinde ve Türkiye'de yapılmış diğer araştırmalarda da C282Y mutasyonu gözlenmemiştir. Fakat, Çek Cumhuriyeti, Tunus ve İtalya'nın Apulian bölgesindeki popülasyon taramalarında homozigot C282Y mutasyonu görülmezken, bu mutasyonun heterozigot genotip sıklığı Çek Cumhuriyeti'nde % 7.87 ve Apulian bölgesinde % 3 olarak bulunmuştur. Tunus popülasyonunda ise C282Y mutasyonu alel frekansı % 0.09 olarak hesaplanmıştır (76-78). Ayrıca, Danimarka Danes ve Polonya Slavic popülasyonlarında C282Y mutasyonu için homozigot mutant sıklığının sırasıyla % 0.36 ve % 0.12 olduğu gözlenmiştir. C282Y heterozigot taşıyıcıların frekansı ise Danimarka Danes popülasyonunda % 10.6, Polonya Slavic popülasyonunda % 6.0 olarak belirlenmiştir (80, 83). Bu durum bize C282Y mutasyon sıklığının tüm popülasyonlarda düşük olduğunu göstermektedir.

S65C mutasyonu için sağlıklı bireylerde gerçekleştirilmiş olan popülasyon taramalarında alel frekansları, İtalya'nın Apulian bölgesinde % 1.1, İspanya'nın Catalonia bölgesinde % 0.01 ve Ekvatorda % 0.04 olarak belirlenmiştir. Birçok

çalışmada değerlendirmeye alınmamış olan S65C mutasyonu, 141 sağlıklı kontrol bireyinde yapmış olduğumuz araştırmada gözlenmemiştir (76, 79, 87). Bu bize, S65C sıklığının çok düşük olduğunu, bizim popülasyonumuzda da bulunmadığını veya seyrek görüldüğünü ortaya koymaktadır.

HFE gen mutasyonlarından birisi olan H63D mutasyonu için gerçekleştirilmiş olan popülasyon taramalarında Yunan popülasyonunda heterozigot taşıyıcı bireylerin sıklığı % 16.2, homozigot mutant bireylerin ise % 0.75 bulunurken, Çek Cumhuriyetinde ise homozigot mutant % 0.78 ve taşıyıcı % 26.84 olarak belirlenmiştir. İtalya'nın Apulian bölgesinde, Danimarka'nın Danes etnik grubunda H63D mutasyonu için homozigot mutantların sıklıkları sırasıyla % 1 ve % 1.6, heterozigot taşıyıcıların ise % 26 ve % 23.4 olarak belirlenmiştir (75, 76, 77, 80). Araştırmamızda ise heterozigot H63D mutasyon sıklığı % 21.28, homozigot mutant olanların sıklığı % 1.42 olarak hesaplanmıştır. Alel frekansı ise % 12.06 olarak tespit edilmiştir. Danimarka ve Tunus popülasyon sonuçlarının Türkiye'de belirlenmiş olan değerlere yakın olduğu görülmektedir. H63D mutasyonu alel frekansı İspanya'nın Catalonia bölgesinde % 0.2, Kore'de % 3.8, Polonya'nın Slavic bölgesinde % 1.5, Tunus'ta % 15.17 ve Ekvator popülasyonlarında % 0.05 olarak belirlenmiştir (79, 81, 83, 88). Sağlıklı popülasyonlarda gerçekleştirilmiş olan taramalarda H63D mutasyonu genotip ve alel sıklıklarının heterojenite gösterdikleri belirlenmiştir. H63D mutasyon oranının birçok popülasyonda yüksek olması ve heterozigot taşıyıcılarda biyokimyasal demir değerlerinin düşük bulunması bu değişimin penetransının düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bazı araştırmacılar HFE genindeki bu mutasyonların normal sağlıklı bireylerde de bulunmasından dolayı birer mutasyon değil polimorfizm oldukları şeklinde görüşler ileri sürmektedirler. Bu yüzden HFE gen mutasyonlarının etkisinin olup olmadığının net olarak açıklanabilmesi için diğer genetik ve çevresel faktörlerden arındırılmış in vivo deney modellerinin geliştirilmesi gerekmektedir (94-97).

Çalışmamızda idiyopatik siroz hastalarında ve sağlıklı kontrol bireylerinde HFE gen mutasyonlarının analizinde PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Popülasyon taraması ve HFE gen mutasyonları (C282Y, H63D, S65C) ile çeşitli tipteki hastalıklar arasındaki ilişkiyi belirlemek için gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışmada da bu yöntemden yararlanılmıştır (15, 22, 40, 41, 72, 75, 78, 81, 86-88, 93). HFE gen mutasyonlarını tespit etmek için PCR-RFLP yöntemi dışında başka tekniklerde bulunmaktadır. Örneğin, Geiger ve arkadaşları gen mutasyonlarını LightCycler (66), Giuseppina ve arkadaşları ise PCR-RFLP tekniğinin dışında nadir görülen HFE gen mutasyonlarının analizinde reverse-hybridization tekniğini kullanmışlardır (68). Ayrıca, Hellerbrand ve arkadaşları SSCP-CE ve PCR-ELISA yöntemlerini kullanarak PCR-RFLP sonuçlarını değerlendirmişler ve bu yöntemin güvenilir, kısa zamanda sonuç alınabilen ve ucuz bir teknik olduğunu ortaya koymuşlardır (82). PCR reaksiyonunu takiben sekans yöntemi kullanılan çalışmalar da bulunmaktadır (84, 85). Sekans ile HFE gen mutasyonlarından C282Y, H63D ve S65C'nin dışında diğer değişimler de belirlenebilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız PCR-RFLP tekniği laboratuvarımızda uzun zamandan beri uygulanan güvenilir bir teknik olup, içerik ve uygulama bakımından yukarıdaki çalışmalara da uygunluk göstermektedir.

Siroz gelişiminde, demir metabolizması dışında, çeşitli metabolik reaksiyonlarda görev alan genetik faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmüş ve bu genlerdeki değişimlerin etkisini belirlemek için, idiyopatik siroz hastalarında araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Shahrokh ve arkadaşları, GSTI ailesi üyesi olan GSTP1 (Ile105Val) ve GSTM1 polimorfizmlerinin bilinmeyen bir mekanizmayla siroz etiolojisinde rol oynayabileceğini belirtmektedirler. Araştırmacılar, 45 idiyopatik siroz ve 56 sağlıklı kontrol bireyi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada tripleks PCR yöntemi kullanmış ve bu iki polimorfizmin etkisini istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (48). Keratin 8 ve keratin 18 genlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilgili yapılmış araştırmalarda da anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (58). İdiyopatik sirozlu hastalarda çeşitli genlerdeki mutasyonların ve polimorfizmlerin araştırılması ile hastalığın oluşumu ve gelişiminde rol oynayan faktörler daha ayrıntılı olarak ortaya konulacaktır. Ayrıca alkol kaynaklı ve alkol kaynaklı olmayan karaciğer yağlanması, tip 2 diyabet, obezite gibi hastalıklarında siroz gelişiminde etkili olduklarının belirlenmesi, diğer bazı hastalıkların da araştırılmasıyla yararlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde ilk defa onaltı idiyopatik siroz hastasında gerçekleştirilen bu araştırmada, HFE gen mutasyonlarından birisi olan H63D mutasyonunun idiyopatik siroz tanısı almış ve demir değerleri yüksek olan hastalarda araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz. Fakat, HFE gen mutasyonlarının (C282Y, H63D, S65C) daha fazla sayıda idiyopatik siroz hastasında değerlendirilmesi bu mutasyonların etkinliği ile ilgili daha net bilgi verebilir. Ayrıca, HFE genindeki diğer değişimlerin ve demir metabolizmasında görev alan önemli genlerin de karaciğerde demir birikiminde rol oynayabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda örnek sayısı az olmasına rağmen, örnek sayısı artırılarak idiyopatik sirozlu hastalarda demir metabolizması bozukluğunda işe karışan genetik faktörlerden birisi olan HFE gen mutasyonlarının taranması gerekmektedir. İdiyopatik sirozun etiyojisini belirlemek için hastalardaki diğer biyolojik markerlarla ilgili genetik araştırmaların yapılması ve idiyopatik sirozlu hastaların karaciğer örneklerinden çok yönlü genetik çalışmalar gerçekleştirilmesi hastalığın temelindeki genetik faktörleri aydınlatacağı düşüncesindeyiz.

Ülkemizde ilk defa fazla sayıda bireyde yapılan bu çalışma ile popülasyonda H63D mutasyon sıklığının bilinmesinin yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişen demir değerlerinin etkisini ifade etmek bakımından önemli olduğu kanısındayız. İdiyopatik sirozlu hastalarda HFE geni C282Y, S65C, H63D mutasyonlarından başka mutasyon veya mutasyonların etkili olup olmadığının belirlenmesi için DNA dizi analizi yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Noyan A. Yaşam ve Hekimlikte Fizyoloji. Onbirinci baskı, 1999; 882-885.
2. Bothwell T. H, Charlton R. W, Motulsky A. G. Hemochromatosis. The metabolic and molecular disease volume II, 7 Ed., 2237-2269.
3. İliçin, Ünal, Biberoglu, Akalin, Süleymanlar. Temel İç Hastalıkları. 1996.
4. Gasparani P ve Camaschella C. Hereditary hemochromatosis: is the gene race over. Eur J Hum Genet 2004;12: 341-342.
5. Stephen A. Harrison, Bruce R. Bacon. Hereditary hemochromatosis: update for 2003. J Hepatol. 2003; 38: 14-23.
6. Mura C, Raguenes O, Fèrec C. HFE mutation Analysis in 711 Hemochromatosis Probands: Evidence for S65C Implication in Mild Form of Hemochromatosis. Blood. 1999; 93 (8): 2502-2505
7. Tannapfel A, Stölzel U, Köstler E, Melz S, Richter M, Keim V, Schuppan D, Wittekind C. C282Y and H63D mutation of the hemochromatosis gene in German porphyria cutanea tarda patients. Virchows Arch, 2001; 439: 1-5.
8. Limdi J. K ve Crampton J. R. Hereditary haemochromatosis. Q J Med, 2004; 97: 315-324.
9. Meadows C, Lyon E, Miller C. Hemochromatosis mutation detection, C282Y, H63D and S65C. ARUP lab 2002; 1-3.
10. Lal P, Fernandes H, Koneru B, Albanese E, Hameed M. C282Y Mutation and Hepatic Iron Status in Hepatitis C and Cryptogenic Cirrhosis. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124: 1632-1635.
11. Trinder D, Fox C, G Vautier, Olynyk J. K. Molecular pathogenesis of iron overload. Gut 2002; 51: 290-295.
12. Mura C, BaptiseNousbaum J, Verger P, Moalic M, Raguenes O, Mercier A, Ferec C. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. Hum Genet 1997; 101: 271-276.
13. Siroz. <http://www.vitamin.net/saglik/GS/Siroz.htm>.
14. Cirrhosis [http://www.healthandage.com/html/well\\_connected/pdf/doc75.pdf](http://www.healthandage.com/html/well_connected/pdf/doc75.pdf)

15. Boige V, Castèra L, Roux N, Ganne-Carriè N, Ducot B, Pelletier G, Beaugrand M. Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut* 2003; 52: 1178-1181
16. Stephen H. Caldwell, David H. Oelsner, Julia C. Iezzoni, Elizabeth E. Hespeneide, Emily H. Battle, Carolyn J. Driscoll. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*. 1999; 29 (3): 664-669.
17. Cirrhosis, familial. OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=215600>
18. Brissot P, Troadec M, Lorèal O. Intestinal absorption of iron in HFE-1 hemochromatosis: local or systemic process. *J Hepatol*. 2004; 40: 702-709.
19. Chalès G, Guggenbuhl P. When and how we screen for hereditary hemochromatosis? *Joint Bone Spine*. 2003; 70: 263-270.
20. Brandhagen D J, Fairbanks V. F, Baldus W. Recognition and Management of Hereditary Hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 2002; 65 (5): 853-860.
21. Powell L. W, George D. K, McDonnell S. M, Kowdley K. V. Diagnosis of Hemochromatosis. *Ann of Intern Med*. 1998; 129: 925-931.
22. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Kappert G, Adams O, Donner A, Willers R, Niederau C, Häussinger D. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2003; 38: 335-342.
23. Brandhagen D. J, Alvarez W, Therneau T. M, Kruckeberg K. E, Thibodeau S. N, Ludwig J, Porayko M. K. Iron overload in cirrhosis-HFE genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology*. 2000; 31 (2): 456-460.
24. Fletcher L. M, Dixon J. L, Purdie D. M, Powell L. W, Crawford D. H. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2002; 122 (2): 281-289.
25. Adams P. C. Is there a threshold of hepatic iron concentration that leads to cirrhosis in C282Y hemochromatosis? *Am J Gastroenterol*. 2001; 96 (2): 567.
26. Siroz <http://www.hastarehberi.com/dahiliye/dahili4/siroz.htm>.
27. Liver cirrhosis. <http://www.lifeextensionvitamins.com/livercirrhosis.html>.
28. Arezzini B, Lunghi B, Lungarella G, Gardi G. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 486-495.

29. Miller S. A, Dykes D. D, Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16 (3): 1215
30. Hilgard P, Gerken G. Liver cirrhosis as a consequence of iron overload caused by hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *World J Gastroenterol.* 2005; 28; 11 (8): 1241-1244.
31. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Brittenham G. M. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest.* 1995; 96 (1): 620-630
32. Barut G, Balci H, Bozdayi M, Hatemi İ, Özçelik D, Şentürk H. Screening for iron overload in the Turkish population. *Dig Dis* 2003; 21: 279-285.
33. Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, Montosi G, Ventura E. Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents. *J Clin Invest.* 1995; 95 (4): 1824-1831.
34. Morrison E. D, Brandhagen D. J, Phatak P. D, Barton J. C, Krawitt E. L, El-Serag H. B, Gordon S. C, Galan M. V, Tung B. Y, Ioannou G. N, Kowdley K. V. Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis. *Ann Intern Med.* 2003;138 (8): 627-633.
35. Jurczyk K, Wawrzynowicz-Syczewska M, Boroń-aczmarska A, Sych Z. Serum iron parameters in patients with alcoholic and chronic cirrhosis and hepatitis. *Med Sci Monit.* 2001; 7 (5): 962-965.
36. Telatar H, Şimşek Ş. *Gastroenteroloji. Cilt 2, Hekimler Yayın Birliği.* 1993: 555-561, 748-755.
37. Dilek O. N. *Karaciğer. Cilt I ve II,* 2003: 1-16
38. Sutedja S. D, Gow P. J, Hubscher S. G, Elias E. Revealing the cause of cryptogenic cirrhosis by posttransplant liver biopsy. *Transplant Proc* 2004; 36 (8): 2334-2337.
39. OMIM Hemochromatosis; HFE. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=235200>
40. Bozkaya H, Bektaş M, Metin O, Erkan O, İbrahimoğlu D, Dalva K, Akbıyık F, Gürel S, Bozdayi AM, Akay C, Yurdaydın C, Aslan O, Uzunaliimoğlu O. Screening for hemochromatosis in Turkey. *Dig Dis Sci.* 2004; 49 (3); 444-449
41. Şimşek H, Sümer H, Yılmaz E, Balaban YH, Özcebe O, Haşçelik G, Büyükaşık Y, Tatar G. Frequency of HFE mutations among Turkish blood donors according to transferrin saturation: genotype screening for hereditary

hemochromatosis among voluntary blood donors in Turkey. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38 (8): 671-675.

42. Tessari P. Protein metabolism in liver cirrhosis: from albumin to muscle myofibrils. *Curr Opin Nutr Metab Care*. 2003; 6: 79-85.
43. Beutler E. Targeted disruption of the HFE gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95: 2033-2034.
44. Berasain C, Hevia H, Fernandez-Irigoyen J, Larrea E, Caballeria J, Mato JM, Prieto J, Corrales FJ, Garcia-Irevijano ER, Avila MA. Methylthioadenosine phosphorylase gene expression is impaired in human liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1690 (3): 276-284.
45. Lizardi-Cervera J, Motola-Kuba D, Guevara-Gonzalez L. Obesity and its association with cryptogenic cirrhosis and hepatocarcinoma. *Gac Med Mex*. 2004; 140 Suppl 2: 77-83
46. Duseja A, Nanda M, Das A, Das R, Bhansali A, Chawla Y. Prevalence of obesity, diabetes mellitus and hyperlipidaemia in patients with cryptogenic liver cirrhosis. *Trop Gastroenterol*. 2004; 25 (1): 15-17.
47. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, Perrella A, Perrella O. Clinical presentation and prevalence of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cryptogenic cirrhosis and features of metabolic syndrome. *Can J Gastroenterol* 2004; 18 (6): 381-386.
48. Ghobadloo S. M, Yaghmaei B, Bakayev V, Goudarzi H, Noorinayer B, Rad F. H, Samily S, Aghabozorgi S, Zali M. R. GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms in patients with cryptogenic liver cirrhosis. *J Gastrointest Surg*. 2004; 8: 423-427.
49. Powell E. E, Cooksley W. G, Hanson R, Searle J, Halliday J. W, Powell L. W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990; 11 (1): 74-80.
50. Sanjeevi A, Lyden E, Sunderman B, Weseman R, Ashwathnarayan R, Mukherjee S. Outcomes of liver transplantation for cryptogenic cirrhosis: a single-center study of 71 patients. *Transplant Proc* 2003; 35 (8): 2977-2980.
51. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro I, Maeshiro I, Kobashigawa K, Kinjo F, Saito A. Clinical characteristics of patients with cryptogenic liver cirrhosis in Okinawa, Japan. *Hepatogastroenterology*. 2003; 50 (54): 2005-2008
52. Carella A. M, Bianco G, Carella M, Gasparini P. Diagnosis of hereditary hemochromatosis with molecular analysis of DNA in patients with anti-HCV positive liver cirrhosis. clinical case. *Minerva Med*. 1998; 89 (9): 323-327.



53. Liver Disease. <http://www.lbah.com/liver.htm>.
54. Rosen H. R. Liver disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Clin Liver Dis* 1998; 2 (1): 175-185
55. Diehl A. M. Alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 1998; 2 (1) :103-118.
56. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002; 123 (1): 134-140.
57. Ong J, Younossi Z. M, Reddy V, Price L. L, Gramlich T, Mayes J, Boparai N. Cryptogenic cirrhosis and posttransplantation nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Transpl*. 2001; 7 (9): 797-801.
58. Ku N. O, Wright T. L, Terrault N. A, Gish R, Omary M. B. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* 1997 1;99 (1): 19-23.
59. Mitchell M. L, Filippone M. D, Wozniak T. F. Metastatic carcinomatous cirrhosis and hepatic hemosiderosis in a patient heterozygous for the H63D genotype. *Arch Pathol Lab Med*. 2001; 125 (8): 1084-1087.
60. Guyader D, Jouanolle H, Brissot P. Metabolic cirrhosis (hemochromatosis, Wilson's disease, erythropoietic protoporphyria) *Rev Prat*. 1991; 41 (13): 1166-1169.
61. Pellise M, Gonzalez-Abraldes J, Navasa M, Miquel R, Bruguera M. Hepatocellular carcinoma in a patient with hereditary hemochromatosis without cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2001; 24 (3): 132-134.
62. Zhang J, Krinsky G. A. Iron-containing nodules of cirrhosis. *NMR Biomed*. 2004; 17 (7): 459-464.
63. Adams P. C. Is there a threshold of hepatic iron concentration that leads to cirrhosis in C282Y hemochromatosis? *Am J Gastroenterol*. 2001; 96 (2): 567-569
64. Gentry-Nielsen M. J, Preheim L. C, Lyman K. N, McDonough K. H, Potter B. J. Use of rat models to mimic alterations in iron homeostasis during human alcohol abuse and cirrhosis. *Alcohol*. 2001; 23 (2): 71-81
65. Beaton M, Guyader D, Deugnier Y, Moirand R, Chakrabarti S, Adams P. Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology*. 2002; 36 (3): 673-678.

66. Geier A, Reugels M, Weiskirchen R, Wasmuth H E, Dietrich C G, Siewert E, Gartung C, Lorenzen J, Bosserhoff A K, Brugmann M, Gressner A M, Matern S, Lammert F. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2004 Aug;24(4):285-94.
67. Gehrke S G, Stremmel W, Mathes I, Riedel H D, Bents K, Kallinowski B. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med*. 2003; 81 (12): 780-787. Epub. 2003; 14.
68. Candore G, Mantovani V, Balistreri C R, Lio D, Colonna-Romano G, Cerreta V, Carru C, Deiana L, Pes G, Menardi G, Perotti L, Miotti V, Bevilacqua E, Amoroso A, Caruso C. Frequency of the HFE gene mutations in five Italian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 2002; 29 (3): 267-273
69. Lyon E, Frank E L. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem*. 2001; 47 (7): 1147-1156.
70. Hanson E H, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis. *Human Genome Epidemiology network. HuGE Review*, 2001; 154 (3): 193-206.
71. Beutler E, Felitti V, Gelbart I, Ho N. Genetics of iron storage and hemochromatosis. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29 (4): 495-498.
72. Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwanner M, schöniger-Hekele M, Hackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Müller C, wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98 (2): 442-447.
73. Mason A. Viral induction of type 2 diabetes and autoimmune liver disease. *J Nutr*. 2001; 131 (10): 2805-2808.
74. Lazerow S K, Abdi M S, Lewis J H. Drug-induced liver disease 2004. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005; 21: 283-292.
75. Papazoglou D, Exiara I, Speletas M, Panagopoulos I, Maltezos E. Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol*. 2003; 109 (3): 137-140.
76. Pietrapertosa A, Vitucci A, Campanale D, Palma A, Renni R, Delios G, Tannoia N. HFE gene mutations in an Apulian population: allele frequencies. *Eur J Epidemiol*. 2003; 18 (7): 685-689.
77. Cimburova M, Putova I, Provaznikova H, Horak J. Hereditary hemochromatosis: detection of C282Y and H63D mutations in HFE gene by

means of Guthrie cards in population of Czech Republic. *Genet Epidemiol.* 2002; 23 (3): 260-263.

78. de Diego C, Murga MJ, Martinez-Castro P. Frequency of HFE H63D, S65C, and C282Y mutations in patients with iron overload and controls from Toledo, Spain. *Genet Test.* 2004; 8 (3): 263-267.
79. Altes A, Ruiz A, Barcelo MJ, Remacha AF, Puig T, Maya AJ, Castell C, Amate JM, Saz Z, Baiget M. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test.* 2004; 8 (4): 407-410.
80. Milman N, Pedersen P, Ovesen L, Melsen GV, Fenger K. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in 2501 ethnic Danes. *Ann Hematol.* 2004; 83 (10): 654-657.
81. Choi SJ, Min WK, Chun S, Park H, Kim JW, Park CJ, Chi HS. Frequencies of C282Y and H63D mutations and transferrin saturation indices in the Korean population. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40 (7): 689-692.
82. Hellerbrand C, Bosserhoff AK, Seegers S, Lingner G, Wrede C, Lock G, Scholmerich J, Buttner R. Mutation analysis of the HFE gene in German hemochromatosis patients and controls using automated SSCP-based capillary electrophoresis and a new PCR-ELISA technique. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36 (11): 1211-6.
83. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med Sci Monit.* 2001 ; 7 (3): 441-443.
84. Simsek H, Balaban Y. H, Yilmaz E, Sumer H, Buyukasik Y, Cengiz C, Ozcebe O, Hascelik G, Tatar G. Mutations of the HFE gene among Turkish hereditary hemochromatosis patients. *Ann Hematol.* 2005 [Epub ahead of print].
85. Karimi M, Yavarian M, Delbini P, Hartevelde C. L, Farjadian S, Fiorelli G, Giordano P. C. Spectrum and haplotypes of the HFE hemochromatosis gene in Iran: H63D in beta-thalassemia major and the first E277K homozygous. *Hematol J.* 2004; 5 (6): 524-527.
86. Jazayeri M, Bakayev V, Adibi P, Haghghi Rad F, Zakeri H, Kalantar E, Zali M. R. Frequency of HFE gene mutations in Iranian beta-thalassaemia minor patients. *Eur J Haematol.* 2003; 71 (6): 408-411.
87. Leone PE, Gimenez P, Collantes JC, Paz-y-Mino C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Ann Hematol.* 2005; 84 (2): 103-105

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Manisa ilinin Turgutlu ilçesinde doğan Saffet ÖZTÜRK, 1997 tarihinde Turgutlu Lisesinden mezun olmuştur. 1997-1998 eğitim-öğretim yılında Hacettepe Üniversitesi, İngilizce Hazırlık Okulunu; 1998-2002 yılları arasında ise Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü ikincilik derecesi ile tamamlamıştır. 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamış ve aynı yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsünde araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Aynı anabilim dalında görevine devam etmektedir.