T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANTALYA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİNDE GHRELİN, HEPSİDİN VE HIF-2α'NIN DEMİR METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

Dr. Esra RIZAOĞULLARI GÜZEL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANTALYA/2023

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANTALYA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİNDE GHRELİN, HEPSİDİN VE HIF-2α'NIN DEMİR METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

Dr. Esra RIZAOĞULLARI GÜZEL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANTALYA/2023

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yazımı aşamasında tecrübesi, bilgisi ve özverisi ile her daim yanımda olan ve yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Erdal Kurtoğlu'na ve Biyokimya Kliniği Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ayşegül Uğur Kurtoğlu'na;

Asistanlık eğitimime büyük katkısı bulunan S.B.Ü Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Klinik Eğitim Sorumlusu Prof. Dr. Ayhan Hilmi Çekin başta olmak üzere asistanlık sürecim boyunca eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma ve kliniğimizin uzmanlarına;

Asistanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım; asistan arkadaşlarıma ve hemşirelerimize;

Tüm hayatım boyunca her konuda desteği ile yanımda olan, sevgili anneme ve kardeşime; yol arkadaşım ve eşim Ferit Enes Güzel'e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Esra RIZAOĞULLARI GÜZEL

Antalya, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **iv**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **v**

KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ÖZET ..... **viii**

ABSTRACT ..... **x**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. DEMİR METABOLİZMASI 3

2.1.1. Demir Emilimi 3

2.1.2. Demir Döngüsü 4

2.1.3. Demirin Hücre İçine Alınması 5

2.1.4. Mitokondri ve Demir 6

2.1.5. Demir Metabolizmasının Kontrolü 6

2.1.6 Hücresel Demir Homeostazı 7

2.1.7 Demir Düzenleyici Proteinler 7

2.1.8 Demir ve Hipoksi Sinyal Yolağı 8

2.1.9 Sistemik Demir Homeostazı 9

2.1.10 Hepsidin Sentezinin Demir Tarafından Kontrolü 9

2.1.11 Hepsidin Sentezinin Eritropoez Tarafından Kontrolü 10

2.1.12 Fazla Demirin Depolanması 11

2.2. DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ 11

2.2.1. Demir Eksikliği Anemisi Tanımı ve Saptanması 11

2.2.2. Demir Eksikliği Anemisinin Nedenleri 13

2.2.3. Demir Eksikliği Anemisinde Klinik 13
2.2.4. Demir Eksikliği Anemisinde Tanı ve Ayrıcı Tanı 14
2.2.4.1. Demir eksikliği anemisinde ayırıcı tanı 16
2.2.5. Demir Eksikliği Anemisinde Tedavi 17
2.2.5.1. Oral demir tedavisi 17
2.2.5.2 Parenteral demir tedavisi 18
2.3. GHRELİN 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. ÇALIŞMA ŞEKLİ VE TÜRÜ 21
3.2. OLGU SEÇİMİ 21
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER 23
3.3. İSTATİKSEL ANALİZ 24
4. BULGULAR 24
5. TARTIŞMA 31
5.1. ÇALIŞMA KISITLIKLARI 37
6. SONUÇLAR 38
7. KAYNAKLAR 40
8. EKLER 45
9. ÖZGEÇMİŞ 46

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Demir Eksikliği Anemisinin Nedenleri 13
Tablo 2. Demir Eksikliği Anemisinde Ayırıcı Tanı 17
Tablo 3. Parenteral Tedavi Endikasyonları 19
Tablo 4. Demografik Özellikler 25
Tablo 5. Hasta ve Kontrol Grubunun Hemoglobin ve Ferritin Değerleri 25
Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubunun Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri 26
Tablo 7. Kontrol Grubunda Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon 28
Tablo 8. Hasta Grubunda Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon 28
Tablo 9. Kontrol Grubunda Hemoglobin ve Ferritin Değerleri İle Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon 29
Tablo 10. Hasta Grubunda Hemoglobin ve Ferritin Değerleri İle Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon 29
Tablo 11. Hastalarda Demir Eksikliği Anemisinin Tahmininde Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeylerinin Ayırt Edici Performansı 30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Demirin Enterositlerden Emilimi ve Dolaşıma Katılması 4
Şekil 2. Çalışma Gruplarının Hepsidin Düzeyleri 26
Şekil 3. Çalışma Gruplarının HIF2α Düzeyleri 27
Şekil 4. Çalışma Gruplarının Ghrelin Düzeyleri 27
Şekil 5. Hepsidin, HIF2α ve Ghrelin Düzeylerinin Demir Eksikliği Anemisi Olan Hastaları Belirlemede Ayırt Edici Performanslarının Karşılaştırılması 30

KISALTMALAR DİZİNİ

3'UTR : Untranslated Region; Downstream

5'UTR : Untranslated Region; Upstream

ABCB10 : ATP Binding Cassette Subfamily B Member 10

ALA : 5-Aminolevulinik Asit

ALAS-2 : Aminolevulinik Asit Sentetaz-2

BKİ : Beden Kitle İndeksi

BMP-6 : Bone Morphogenetic Protein 6

Dcytb : Duodenal citokrom b

DE : Demir Eksikliği

DEA : Demir Eksikliği Anemisi

DMT-1 : Divalent Metal Transporter-1

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GDF-15 : Growth and Differentiation Factor 15

GHS-R : Growth Hormone Secretagogue Receptor

HAMP : Hepcidin Antimicrobial Peptide

Hb : Hemoglobin

HIF-2α : Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör 2-alfa

HJV : Hemojuvelin

HO-1 : Hem Oksijenaz-1

HRE : Hypoxia Response Elements

HTP-1 : Hem Taşıyıcı Protein-1

IQR : Interquartile Range

IRE : Iron Regulatory Elements

IRP : Iron Regulatory Proteins

MCH : Mean Corpuscular Hemoglobine

MCV : Mean Corpuscular Volume

m-ferritin : Mitokondriyal Ferritin

mRNA **:** Messenger Ribonükleik Asit

MT-2 **:** Matriptaz-2

NSAİ **:** Non Steroid Anti İnflamatuar

Ph **:** Potential of Hydrogen

RDW **:** Red Cell Distribution Width

Steap-1 **:** Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate-1

Steap-4 **:** Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate-4

sTfR **:** Solubl Serum Transferrin Reseptörü

TDBK **:** Total Demir Bağlama Kapasitesi

Tf **:** Transferine

TfR-1 **:** Transferrin Reseptörü 1

TfR-2 **:** Transferrin Reseptörü 2

TS **:** Transferrin Saturasyonu

TWSG-1 **:** Twisted Gastrulation Factor 1

WBC **:** White Blood Cell

ÖZET

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİNDE GHRELİN, HEPSİDİN VE HIF-2α'NIN DEMİR METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

Amaç: Demir metabolizmasının düzenlenmesinde hepsidin, HIF-2α ve ferroportin molekülleri önemli bir role sahiptir. Son yıllarda demir eksikliği anemisi olan hastalarda ghrelin seviyesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaların birçoğu çocukluk yaş grubunda yapılmıştır. Çalışmalarda HIF-2α molekülü ile ghrelin ve hepsidin ilişkisini inceleyen literatür mevcut değildir. Biz bu çalışmamızda demir eksikliği anemisi hastalarında serum ghrelin, hepsidin, HIF-2α ve ferritin düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek, ghrelin hormonunun demir metabolizmasını nasıl etkilediğini araştırdık. Bu çalışmamız ile demir eksikliği anemisi hastalarında demir metabolizmasının açıklanmasına katkıda bulunduk.

Yöntem: Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları ve Hematoloji polikliniklerine başvuran hastalarda prospektif kesitsel olarak gerçekleştirildi. Çalışmamız 03.09.2021-30.09.2022 tarihleri arasında planlandı. Çalışmaya katılan her gönüllü çalışma hakkında bilgilendirildi ve tüm gönüllülerden yazılı onam formu alındı. Çalışmamıza 90 gönüllü dahil edildi. Çalışmaya katılan hastaların tamamı kadın cinsiyetten seçildi. Gönüllüler 18-50 yaş aralığında ve premenopozal dönemde idi. Beden kitle indeksi 19-25 arasında olan normal kiloda kişilerdi. Gönüllerin hiçbiri demir tedavisi almamaktaydı. Alınan kan örneklerinden hemogram parametreleri, serum ferritin, HIF-2α, hepsidin, ghrelin düzeyleri çalışıldı. Serum HIF-2α, ghrelin, hepsidin düzeyleri elisa yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: Her iki grubun yaş ve beden kitle indeksi benzer bulundu. Hasta grubundaki hemoglobin ve ferritin değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,001$). Hasta grubunda hepsidin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p=0,002$). Hasta grubundaki ghrelin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0,001$). Her iki grubun HIF-2α düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Kontrol grubunda hepsidin-HIF-2α ($p<0,001$) ve hepsidin-ghrelin ($p<0,001$) düzeyleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Kontrol grubunda HIF-2α ile ghrelin düzeyi arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı

(p<0,001). Hasta grubunda hepsidin-HIF-2α (p<0,001) ve hepsidin-ghrelin (p<0,001) düzeyleri arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Hasta grubunda HIF-2α ile ghrelin düzeyi arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı (p<0,001). Hasta grubunda hemoglobin- HIF-2α (p=0,003) ve hemoglobin-ferritin (p=0,001) düzeyi arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon olduğu belirlendi. Hepsidin ve ghrelin düzeyinin demir eksikliği anemisini belirlemede ayırt edici faktör olduğu görülürken, HIF-2α düzeyinin ise ayırt edici faktör olmadığı belirlendi.

Sonuç: Demir eksikliği anemisi hastalarında hepsidinin düşük olması vücudunun demir emilimini arttırmaya yönelik bir mekanizmadır. HIF-2α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmaması DEA hastalarının mevcut Hb değerlerinde kronik bir hipoksi oluşmaması sebebiyle olabilir. Ghrelin seviyelerinin hasta grubunda düşük saptanması ghrelinin demir metabolizmasında rolü olduğunu düşündürdü. Ghrelin, hepsidin ve HIF-2α arasında hem hasta hem kontrol grubundaki korelasyonlar bu moleküllerin demir metabolizmasında rolü olduğunu göstermektedir. Bu üç molekül arasındaki bağlantıları açıklamak için ileri hücre düzeyinde çalışmalara ihtiyaç olacaktır.

Anahtar kelimeler: Ghrelin, demir, anemi, hepsidin, HIF-2α

ABSTRACT

THE ROLE OF GHRELIN, HEPSIDIN AND HIF-2α IN IRON METABOLISM IN IRON DEFICIENCY ANEMIA

Aim: Hepsidin, HIF-2α and ferroportin molecules have an important role in the regulation of iron metabolism. In recent years, studies on ghrelin levels in patients with iron deficiency anemia have been conducted. Most of the studies were conducted in the childhood age group. There is no literature examining the relationship between HIF-2α molecule and ghrelin and hepsidin. In this study, we investigated how ghrelin hormone affects iron metabolism by examining the relationship between serum ghrelin, hepsidin, HIF-2α and ferritin levels in iron deficiency anemia patients. With this study, we contributed to the explanation of iron metabolism in iron deficiency anemia patients.

Material and Method: Our prospective cross-sectional study was conducted in patients admitted to the Internal Medicine and Hematology outpatient clinics of Health Sciences University Antalya Training and Research Hospital. Our study was planned between 03.09.2021-30.09.2022. Each participant was informed about the study and written informed consent was obtained from all participants. 90 volunteers were included in our study. All of the patients participating in the study were selected from the female gender. The volunteers were between 18-50 years of age and in the premenopausal period. They were of normal weight with a body mass index between 19-25. None of the volunteers were receiving iron therapy. Hemogram parameters, serum ferritin, HIF-2α, hepcidin and ghrelin levels were measured in blood samples. Serum HIF-2α, ghrelin and hepsidin levels were measured by ELISA method.

Results: Age and body mass index of both groups were similar. Hemoglobin and ferritin values were significantly lower in the patient group compared to the control group. Hepcidin values in the patient group were significantly lower than in the control group. The ghrelin values in the patient group were significantly lower than in the control group. There was no significant difference between the HIF-2α levels of both groups. A strong positive correlation was found between hepsidin-HIF-2α and hepsidin-ghrelin levels in the control group. A strong positive correlation was found between HIF-2α and ghrelin levels in the control group. A strong positive correlation

was found between hepsidin-HIF-2α and hepsidin-ghrelin levels in the patient group. A strong positive correlation was found between HIF-2α and ghrelin levels in the patient group. There was a moderate positive correlation between hemoglobin-HIF-2α and hemoglobin-ferritin levels in the patient group. Hepsidin and ghrelin levels were found to be discriminating factors in determining iron deficiency anemia, whereas HIF-2α level was not a discriminating factor.

Conclusion: The low level of hepcidin in iron deficiency anemia patients is a mechanism to increase iron absorption of the body. The fact that no significant difference was found between HIF-2α levels may be due to the absence of chronic hypoxia in the current Hb values of the patients with IDA. Ghrelin levels were found to be low in the patient group, suggesting that ghrelin has a role in iron metabolism. The correlations between ghrelin, hepcidin and HIF-2α in both patient and control groups suggested that these molecules are related to each other. It is known that hepcidin and HIF-2α molecules exert their effects through ferroportin. In line with these relationships, it was thought that ghrelin may also exert its effects on ferroportin. Further cellular studies will be needed to explain the connections between these three molecules.

Keywords: Ghrelin, iron, anemia, hepcidin, HIF-2α

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demir eksikliği dünyadaki en yaygın beslenme bozukluğudur. Dünya genelinde aneminin önde gelen nedenidir. Demir eksikliği anemisi dünya çapında 1.2 milyardan fazla insanı etkiler [1]. Demir eksikliğinin başlıca sebepleri; diyetle azalmış demir alımı, demir absorbsiyonunda azalma ve kan kaybıdır.

Demir eksikliği anemisi hastalarında ghrelin hormonu serum demir düzeylerini artırır. Ghrelin hormonu, özellikle mide fundusu başta olmak üzere hipotalamus, hipofiz, tiroid, ince bağırsak, karaciğer, böbrek, kalp, pankreas ve gonadlar gibi vücudumuzda birçok organda sentezlenmektedir. İştahın düzenlenmesi, büyüme hormonu salgılatıcı özelliği, antiinsülinerjik etki, vazodilatasyon ghrelin hormonunun fizyolojik etkileri olarak belirtilmektedir [2, 3]. Literatürde ghrelin hormonu ve demir metabolizması ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ghrelin peptidinin karaciğer ve dalakta ferroportin-1 molekülünün expresyonunu arttırdığı belirtilmektedir [4].

Bilindiği üzere ferroportin-1 molekülü vücudun ihtiyacına göre bağırsak, karaciğer vb dokulardan seruma demir molekülünün salınımı sağlayan proteindir. Ferroportin-1 molekülünün seviyelerinin düzenlenmesinde hepsidin, hipoksi ile indüklenen faktör 2-alfa (HIF-2α) molekülleri rol almaktadır. HIF-2α molekülleri ferroportinin gen ekspresyonunu artırırken, hepsidin hormonu hücre yüzeyindeki ferroportin molekülüne bağlanmakta ve kompleks halinde hücre içine alınarak ferroportin molekülünün degradasyonuna neden olmaktadır. Demir metabolizması ile ilgili literatürlerde hepsidin hormonunun serum demir düzeyleri yüksek olduğu dönemlerde arttığını ve ferroportinin degradasyonunu sağlayarak demir düzeylerinin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir. HIF-2α molekülleri ise özellikle bağırsak hücrelerinde ferroportin molekülünün gen ekspresyonunu arttırarak serum demir düzeylerini arttırmaktadır [5, 6].

Literatürde demir eksikliği anemisi ile hepsidin ve ghrelin arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Çalışmaların çoğu çocukluk yaş grubunda yapılmıştır [41, 42, 43]. Çalışmalarda HIF-2α molekülü ile ghrelin, hepsidin ilişkisini inceleyen literatür mevcut değildir.

Biz bu çalışmamızda demir eksikliği anemisi hastalarında serum ghrelin, hepsidin, HIF-2α ve ferritin düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek, ghrelin hormonunun demir metabolizmasını nasıl etkilediğini araştırdık. Bu çalışmamız ile demir eksikliği anemisi hastalarında demir metabolizmasının açıklanmasına katkıda bulunduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DEMİR METABOLİZMASI

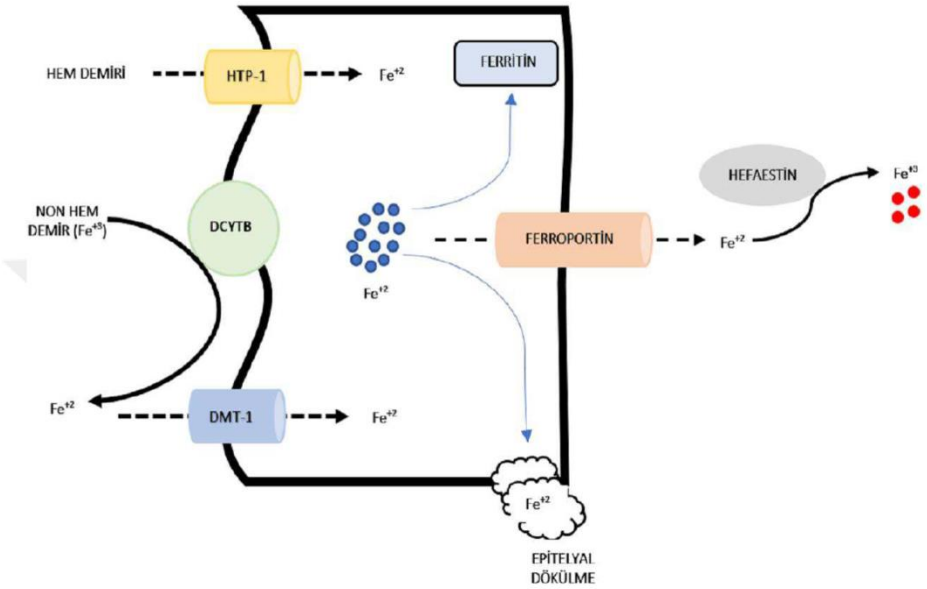
Hücreler hayati öneme sahip çeşitli ferroproteinleri (demir sülfür kümeleri, hem ve hem benzeri proteinler, vs) sentezleyebilmek için demire ihtiyaç duyarlar. Demir, redoks ve katalitik özellikleri nedeniyle oksijen transportu, DNA sentezi ve enerji metabolizması gibi temel biyokimyasal aktiviteler için kofaktördür. Serbest demir reaktiftir ve özellikle aerobik ortamda girdiği reaksiyonlarla reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasına ve hücre doku hasarına yol açar. Bu nedenledir ki demirin proteinler veya küçük organik moleküllerle kompleks halde tutulması zorunludur [7-10].

Ortalama bir erişkin vücudunun demir miktarı yaklaşık 3-4 gr'dir. Bunun çoğunluğu hemoglobinin yapısında bulunmaktadır. Vücuda günlük emilen demir miktarı 1-2 mg/gündür. Bu miktar, vücuttan dökülen cilt hücreleri, ter ve feçesle günlük kaybedilen demir miktarını karşılamaya ancak yeterlidir. Vücutta demir kaybını kontrol eden bir mekanizma bulunmamaktadır. Ancak, demir homeostazı, barsaklardan emilim ve makrofajlardan salınım aşamalarında sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Vücutta özellikle eritropoez için gerekli olan günlük 20-25 mg demir, yaşlanmış eritrositlerden retiküloendotelyal sistem makrofajları tarafından fagosite edilip parçalanması sonucunda ortaya çıkan ve geri dönüştürülen demirden sağlanmaktadır [11, 12].

2.1.1. Demir Emilimi

Vücuttaki demir miktarının en önemli düzenleyicisi, duodenum mukozasından demir emilimidir. Sağlıklı bir diyette yaklaşık 15 mg demir bulunmaktadır. "Hem" demiri et ve et ürünlerinde bulunur ve %25-30 emilime sahiptir. Hem demirinin doğrudan hem taşıyıcı protein tarafından enterosit içerisine alındığı düşünülür. Enterosit içine alındıktan sonra hem oksijenaz-1 (HO-1) enzimi tarafından parçalanıp ferröz demir (Fe) açığa çıkarılır. Sebze, meyve ve tahıllarda bulunan "hem olmayan" demir %10 oranında emilir. Emilimi için ferrik demirin (Fe^{3+}) mukozal tarafta Fe^{2+} 'ye indirgenmesi gerekmektedir. Yiyeceklerdeki demir ağırlıklı olarak

Fe^{3+} değerliklidir ve ph>3 olan ortamda emilimi zayıftır. Fe^{2+} ise duodenumdaki ph 7-8 de bile çözünür ve kolaylıkla emilir. Bu nedenle Fe^{3+} duodenumun mukozal tarafında askorbat bağımlı bir ferroredüktaz olan duodenal sitokrom b (Dcytb) tarafından Fe^{2+} indirgenir. İki değerlikli metal taşıyıcı (Divalent Metal Transporter-1, DMT-1) tarafından duodenal enterosit içine alınır. Enterosit içerisine alınan Fe^{2+}, ya ferritin şeklinde depolanır ya da sitoplazmik demir taşıyıcıları tarafından hücrenin bazolateral membranına getirilerek ferroportin aracılığıyla dolaşıma verilir. Dolaşıma çıkarken eşzamanlı olarak membranda bulunan ve bakır bağımlı bir ferroksidaz olan hefastin tarafından Fe^{3+} 'e oksitlenir ve transferine (Tf) bağlanır [10, 13].



Şekil 1. Demirin Enterositlerden Emilimi ve Dolaşıma Katılması

Hentze ve ark. uyarlanmıştır [14]. (HTP-1: Hem Taşıyıcı Protein-1, Dcytb: Duodenal sitokrom B, DMT-1: Divalan Metal Taşıyıcı-1)

2.1.2. Demir Döngüsü

Plazmada demirin fizyolojik taşıyıcısı olan transferrin, karaciğerden sentezlenir ve normal koşullarda sadece %20-40 oranında Fe^{3+} ile bağlıdır. Her transferrin molekülü iki tane Fe^{3+} bağlar (diferrik –Tf; holo-Tf). Böylece, demir çözünür halde bulunabilir ve potansiyel serbest radikal toksitesi önlenmiş olur. Transferrine bağlı demir tüm vücut demirinin %0.1'inden azını oluştursa da bu havuz çok dinamiktir. Her gün defalarca, yaşlı eritrositlerin yıkımı döngüsüyle yenilenir ve çoğu yine eritropoezde kullanılmak üzere kemik iliğinde eritroid öncüllere aktarılır [13]. Retiküloendotelyal sistem makrofajları yaşlanmış eritrositleri fagosite eder ve

açığa çıkan hemoglobin (Hb) ve hem proteinini metabolize eder. Ayrıca intravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan serbest Hb ve serbest hem, dolaşımda sırasıyla haptoglobin ve hemopeksine bağlanır ve reseptörleri yoluyla makrofajlar tarafından alınır. Makrofaj içine doğrudan alınan veya Hb'nin yıkımı sonucu ortaya çıkan hem, enterositlerde olduğu gibi HO-1 enzimi tarafından metabolize edilerek Fe^{2+} açığa çıkar. Fe^{2+}metabolizma ihtiyacına göre makrofajda ferritin olarak depolanabilir veya ferroportin aracılığıyla dolaşıma verilirken aynı anda dolaşımdaki seruloplazmin tarafından yeniden oksitlenerek Fe^{3+}'e transferrine yüklenir [9].

Eritroid öncüller demiri sadece Tf reseptörleri yoluyla (Tf reseptör 1;TfR-1) içlerine alırlar. Bu nedenle tamamen plazma Tf'ye bağımlıdırlar. Transferin doygunluğunun %100 ulaştığı aşırı demir yüklenme durumlarında plazmada transferine bağlı olmayan demir (Non transferrin bound iron; labile iron) havuzu oluşur. Hepatositler, kardiyomyositler ve bazı endokrin organların hücreleri, eritroid öncüllerden farklı olarak, Tf bağlı olmayan demiri doğrudan alabilme özelliğine sahiptir. Bu durum doku hasarına yol açar [10, 15].

2.1.3. Demirin Hücre İçine Alınması

Diferrik Tf'nin hücre içerisine alınması Tf reseptörleri (TfR-1 ve TfR-2) yoluyla olur. Transferrin reseptörleri (TfR-1), demirin büyük çoğunluğunu kullanan eritroid öncüllerde en fazla oranda ifade edilmektedir. Tf, TfR-1'e bağlandıktan sonra endositoz ile hücre içine alınır. Endozomal vezikül içerisinde asidik ortam oluştuğunda demir Tf'den ayrılır. Fe^{3+}'ün vezikülden sitoplazmaya veya mitokondriye taşınabilmesi için ferroredüktazlar (six transmembrane epithelial antigen of prostate; steap1-4) tarafından Fe^{2+} indirgenmesi gereklidir. Fe^{2+}'nin vezikül membranından sitoplazmaya geçişinde DMT-1 görev alır. Demirin ayrılmasından sonra Tf'nin (apo-Tf) TfR-1'e olan ilgisi azalır. Endozomal vezikül hücre membranına geri döner. Apo-Tf dolaşıma geri verilirken, TfR-1 hücre membran yapısına yeniden katılır [10]. TfR-1'in bir parçası, TfR-1 ligandı diferrik-Tf ile bağlı olmadığında seruma verilir. Dolayısıyla, çözünür halde bulunan sTfR (solubl serum TfR) düzeyi, demir eksikliğinde yükselir [16]. Sitoplazma içine alınan Fe^{2+} şaperon proteinler ile kimyasal reaktivitesi kısmen kontrol altına alındıktan sonra, ferroproteinlerin, demir sülfür

kümelerinin yapısına girer ve mitokondride hem sentezi için kullanılır. İhtiyaç fazlası demir ise sitoplazmik ferritin içerisinde depolanır.

2.1.4. Mitokondri ve Demir

Hücreler demiri mitokondride hem ve demir sülfür kümelerinin sentezi için kullanmaktadırlar. Demirin mitokondriye taşınması henüz net açıklanamamıştır. Eritroid hücrelerden elde edilen veriler demirin endozomal vezikülden doğrudan mitokondriye transfer edildiği kiss and run mekanizmasına işaret etmektedir. Eritroid dışı hücrelerde ise demir önce sitoplazmaya verilmekte sonra mitokondriye yönlenmektedir. Hücre içi demirin hissedilmesi ve yönlendirilmesinde glutaredoksinler görev almaktadır. Demirin mitokondri içerisine alınmasında mitokondrinin iç membran proteinleri mitoferrin1 ve mitoferrin 2 görev alır. Ağırlıklı olarak eritroid hücrelerde bulunan mitoferrin 1, ATP- bağlayan taşıyıcı protein (ABCB10) ve ferroşelataz ile etkileşerek demirin hem sentezine katılımı için yolak oluşturur [17]. Sentezlenen hem proteinin, hemoglobin ve diğer hemoproteinlerinin yapısına girebilmesi için mitokondri dışına nasıl taşındığı bilinmemektedir. Mitokondrinin kendisine özel lokal demir deposu olarak mitokondriyal ferritin (m-ferritin) de bulunmaktadır.

Hem proteinin sentezi, bir kısmı mitokondride, bir kısmı sitoplazmada gerçekleşen 8 basamaklı bir enzimatik yolaktır. İk basamak olan 5-aminolevulinik asit (ALA) sentezi mitokondride gerçekleşir ve eritroid olmayan hücrelerde hız sınırlayıcı basamaktır. Sitoplazmada gerçekleşen 5 basamak reaksiyonun ardından protoporfirinojen IX oluşur ve protoporfirin IX halkasına oksitlendikten sonra ferroşelataz enzimi tarafından Fe^{2+} eklenerek hem oluşturulur. Bu basamak demire mutlak ihtiyaç duyar. Eritroid öncüller için hız sınırlayıcı basamaktır. Oluşturulan hem, hemoproteinlerin yapısına girmek üzere sitoplazmaya verilir [18].

2.1.5. Demir Metabolizmasının Kontrolü

Vücut için eser element olan demirin, vücutta dengede tutulması gerekir. Hücresel düzeyde demirin hem eksikliğinin hem de fazlalığının patolojik etkileri vardır. Bu nedenle demir metabolizması özellikle barsaklardan emilim ve makrofajlardan salınım aşamasında olmak üzere sıkı denetim altındadır. Demir metabolizmasının kontrolü hücresel ve sistemik olarak düzenlenir.

2.1.6 Hücresel Demir Homeostazı

Hücrelerin büyük bir kısmı ihtiyaçları doğrultusunda demir alımını otonom olarak kontrol etmektedir. Bu hücreler demiri dolaşıma vermezler. Ancak hücre ölümü gerçekleştiğinde makrofajlar tarafından demirin geri dönüşümü sağlanır. Buna karşılık, demiri hücre dışına ve dolaşıma verebilen dolayısıyla tüm organizmanın ihtiyacını karşılayabilen özelleşmiş hücreler (duedonal enterositler, makrofajalar, hepatositler, plasental sinsityotrofoblastlar, kan beyin bariyerini oluşturan endotelyal hücreler ve eritroid hücreler) bulunmaktadır.

2.1.7 Demir Düzenleyici Proteinler

Hücresel demir homeostazında hücrenin kendi ihtiyacını karşılamaya yetecek kadar demiri alıp kullanabilmesi amaçlanmaktadır. Bu sistem, demirin hücre içine alınıp reaksiyonlarda kullanılması, fazla demirin ferritin olarak depolanması ve demirin hücre dışına taşınması aşamalarında denetim sağlamaktadır. Sitoplazmada bulunan ve hücre içindeki demiri hisseden demir düzenleyici proteinler (Iron regulatory proteins; IRP), demir metabolizmasındaki kilit proteinlerin mRNA'ları üzerinde 30 nükleotidlik bölgeyi içeren demir düzenleyici elemanlarla (Iron regulatory elements; IRE) etkileşime geçerek hücresel demir homeostazının transkripsiyon sonrası kontrolünü sağlarlar. IRP'lerin IRE'lere bağlandığı bölge eğer kodlayan genin 5'UTR (untranslated region; upstream) bölgesiyle ilgili ise genin transkripsiyonunu baskılanır. Buna karşılık IRP'lerin IRE'lere bağlandığı bölge eğer kodlayan genin 3'UTR (untranslated region; downstream) bölgesi ise ilgili genin transkripsiyonu artar. IRP/IRE sistemi tarafından düzenlenmeye tabi tutulan proteinler; demir transportunda görev alan TfR-1, DMT-1 ve ferroportin, hem sentezinin ilk basamağını katalize eden aminolevunik asit sentaz-2 (ALAS-2) enzimi, hücre siklusu ve hücre iskeletinin yapısını etkileyen proteinler (Cdc 14A, MRCKα) ile ferritindir.

Demir hemostazında major düzenleyicinin IRP-2 olduğu, IRP-1 'in ise böbreklerde hipoksi tarafından uyarılabilen faktör (Hypoxia inducible faktör; HIF-2α) sentezini kontrol ettiği anlaşılmıştır [19].

Demir eksikliğinde, IRP'ler bağlayacak demir bulamazlar ve IRE'lerle bağlanabilir duruma geçerler. Ferritin, ferroportin ve ALAS-2 enzimini kodlayan genlerin 5'UTR'dki IRE'lere bağlanarak bunların transkripsiyonunu bloke ederken,

TfR-1 ve DMT-1'in 3'UTR'deki IRE'lere bağlanarak bunların transkripsiyonunu artırırlar. Böylece, demir eksikliğinde, yanıt olarak, hücrelere demir alımında artış, demirin depolardan mobilizasyon ve demir kullanımında azalma sağlamaktadır. Demir fazlalığında ise IRP'ler demir bağladıklarından yapıları değişir ve IRE'lere bağlanamazlar. TfR-1 sentezi azalarak hücre içine demir alınması engellenir, ferritin sentezi artarak hücre içindeki fazla demir depolanmaya çalışılır [9].

2.1.8 Demir ve Hipoksi Sinyal Yolağı

Her ne kadar fizyolojik ilişkileri henüz detaylı olarak açıklanmamış olsa da, hipoksi sinyal yolağı hücresel demir homeostazı ile etkileşim halindedir. Hipoksi tarafından uyarılabilen faktör transkripsiyon faktörlerini inaktive hidroksilazlar, katalitik kofaktör olarak demiri kullandıklarından, O_2 basıncının yanı sıra demir konsantrasyonuna da hassasiyet göstermektedir [20, 21].

Son dönem yapılan çalışmalar, duedonal enterositlerin akut hipoksi durumunda demir emilimini sistemik kontrolden bağımsız, otonom olarak düzenlenebildiğini göstermiştir. Hipoksi tarafından uyarılabilen faktörler hipoksiye hücresel adaptasyonda önemli kilit faktörlerdir. HIF bir heterodimerdir ve ekspresyonu temel olarak oksijen tarafından düzenlenir. HIF heterodimeri 2 sarmal-döngü-heliks proteininden oluşmaktadır. Oksijene ve demire duyarlı bileşen olan bir α düzenleyici alt birim ve aynı zamanda aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatörü olarak da bilinen ve yapısal olarak eksprese edilen β-alt birimi içerir. Üç düzenleyici HIF alt birimi klonlanmış ve HIF-1α, HIF-2α ve HIF-3α olarak adlandırılmıştır. Hipoksi ve demir eksikliği durumlarında HIFα degredasyonu engellenir, böylece HIFα, çekirdeğe geçerek burda HIF1β ile dimer oluşturur. HIFα/ HIF1β heterodimeri DNA'daki HRE (Hypoxia response elements)'ye bağlanarak transkripsiyonu uyarır. Son zamanlarda, HIF-2'nin de duodenal enterositlerde aynı mekanizma ile demir hemostazında kilit proteinlerin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Hipoksi, demir eksikliği ve artmış eritropoezde duodenal enterositlerde HIF-2α artar ve HRE'ler yoluyla DMT-1, Dcytb ve ferroportin sentezini artırır. Ayrıca, eritropoetinin duedonal enterositlerdeki eritropoetin reseptörlerine bağlanarak demir transportunda görev yapan proteinlerin sentezini arttırdığı ve artmış eritropoezde, sistemik düzenlemeden bağımsız olarak, doğrudan eritrositler üzerine etki edebildiği gösterilmiştir [20, 21].

2.1.9 Sistemik Demir Homeostazı

Demirin ferroportin aracılığıyla enterositlerden ve makrofajlardan dolaşıma verilmesi sistemik demir homeostazın için önemli aşamalardır. Bu basamakların kontrolü hepsidin tarafından sağlanır. Hepsidin karaciğerden sentezlenen bir peptit hormondur. Geni 19. Kromozom üzerindeki HAMP genidir. Hepatositlerde öncül propeptit olarak ifade edilir. Pro-hepsidinin proteolizisi yoluyla 25 aminoasitlik aktif molekül açığa çıkar ve dolaşıma verilir ve idrarda atılır.

Hepsidinin yegane reseptörü olan ferroportin, çoğu hücrede düşük seviyede bulunsa da demir transportunda profesyonel olarak görev alan duodenal enterositlerde ve splenik makrofajlarda çok yüksek düzeyde ve hepatositlerde orta düzeyde bulunmaktadır. Hepsidin, ferroportin'e bağlanıp onun endositozla hücre içine alınıp lizozomal yıkımını sağlar. Böylece, diyetle alınan demirin duodenal enterositlerden, geri dönüşüme giren demirin makrofajlardan ve depolanmış demirin hepatositlerden plazmaya verilmesini önler. Sonuçta demirin plazmaya ve hücre dışı sıvılara geçişi güçlü bir şekilde engellenmiş olur [14, 22].

Hepsidin sentezi ağırlıklı olarak transkripsiyon aşamasında denetlenmektedir. Hepsidin sentezi; plazma diferrik-Tf ve hepatositlerde depolanmış demir tarafından arttırılır (Depo düzenleyicisi) ve eritroid öncüllerin artmış demir gereksinimi ile baskılanır. (Eritropoetik düzenleyici) [23].

2.1.10 Hepsidin Sentezinin Demir Tarafından Kontrolü

Demir, hepatositlerde ve enterositlerde kemik morfogenik protein (Bone morphogenetic protein 6; BMP-6) sentezini uyarır. BMP-6 plazmaya verildikten sonra hepatosit yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. BMP reseptörü, ligantı olan BMP-6'ya bağlandığında aktifleşen bir serin-treonin kinazdır ve sitoplazmadaki SMAD (1/5/8) proteinlerine fosfor ekleyerek onları aktifleştirir. Bunlar, SMAD-4 ile birlikte heterodimerler oluşturup çekirdeğe girerek hepsidin transkripsiyonunu artırır. Bir yandan artmış depo demiri BMP-6 sentezini uyarırken diğer yandan artmış Tf satürasyonu BMP reseptörünün BMP-6ya olan hassasiyetini artırır [24, 25].

Demir-Tf satürasyon sinyalinin hücre tarafından nasıl algılandığı tam olarak bilinmemekle birlikte günümüzde, demir-Tf konsantrasyonuna göre TfR-1, TfR-2 ve bunlara bağlanabilen hemokromatoz proteini HFE'nin görev aldığı bir model yaygın

kabul görmektedir. Diferrik-Tf, HFE ile Tfl'e bağlanmak için yarış halindedir. Demir yeterli ise TfR-1, differik-Tf 'e bağlanır ve HFE-TfR-1'den ayrılıp TfR-2'ye bağlanarak TfR-2'yi stabilize eder. Mekanizma tam olarak netlik kazanmamış olsa HFE-TFR-2 kompleksinin, BMP reseptör sinyal yolağı için koreseptör görevi yapan hemojuvelin (HJV)'nin BMP'ye bağlanmasını artırıp bu yolağın uyarılmasını ve hepsidin sentezini arrtırdığına inanılmaktadır [26].

Demir eksikliğinde olduğu gibi düşük differik-Tf konsantrasyonunda ise HFE TfR ile bağlı halde kalır, TFR-2'ye bağlanan HFE azalınca HJV BMP etkileşimi ve dolayısıyla hepsidin sentezi azalır. HJV hücre membranında bulunan neogenin bir membran protezı olan matriptaz-2 (MT-2) ile ilgili üçlü bir kompleks oluşturduğunda, HJV parçalanmakta ve BMP sinyal yolağı baskılanmaktadır [27].

Matriptaz-2 ifadesi, hipoksi, BMP-6, demir ve inflamasyon ile kontrol edilmektedir. Matriptaz-2 mutasyonları ise demire dirençli demir eksikliği anemisi (Iron refractory iron deficiency anemia; IRIDA) ile ilişkilidir. Hepatositlerde depolanmış demir, BMP-6 mRNA ve BMP-6 proteinini artırır. Böylece BMP/SMAD yolağı aktifleşerek hepsidin transkripsiyonu uyarılır. Enfeksiyon ve inflamasyonda seum hepsidin konsantrasyonu oldukça artmaktadır. Bunun konağın savunma mekanizmasının bir parçası olduğuna inanılmaktadır. İnflamasyonda artan IL-6 Jak-STAT3 yolağını uyararak hepsidin transkripsiyonunu arttırmaktadır [28, 29].

2.1.11 Hepsidin Sentezinin Eritropoez Tarafından Kontrolü

Eritropoetik düzenleyici, kemik iliğinden gelen sinyallerle çalışmaktadır ve demir emilimi üzerindeki en güçlü uyarandır. Eğer eritropoetik aktivite çok artarsa kemik iliğindeki eritropoezin demir ihtiyacını karşılamak üzere depolara bakılmaksızın barsaklardan demir emilimi olmaktadır. Anemi ve hipoksi, hepsidin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Bu, artmış eritropoetin ve bunun sonucunda kemik iliğindeki eritroid öncüllerin artması ile gelişen dolaylı bir etkidir. Beta talasemi ve konjenital diseritropoetik anemiler gibi artmış fakat inefektif eritropoezin olduğu patolojik durumlarda, apopitoza gitmekte olan eritroid öncüller hepsidini baskılayan faktörler üretmektedir. Bu nedenle talasemi intermedia'da organizma demir fazlalığı olduğu halde barsaklardan demir emilimi fazladir. Geç dönem eritroblastlardan üretilen büyüme farklılaşma faktörü (Growth and differentiation factor 15; GDF-15),

erken dönem eritroblastlardan üretilen twisted gastrulation factor (TWSG-1) ve eritroid öncüllerden üretilen eritroferronun (erfe) bu baskılanmada rol oynadıkları düşünülmektedir [30, 31].

2.1.12 Fazla Demirin Depolanması

Fazla demir ya kullanılmak üzere dolaşıma verilir ya da ferritin veya hemosiderin olarak depolanır. Ferritin, farklı genler tarafından kodlanan 2 alt üniteye sahiptir (H-ferritin ve L-ferritin). Bu üniteler, ortasında 4500 adet Fe^{3+} iyonu depolama kapasitesi olan deniz kabuğu şeklinde bir yapı oluştururlar. L-ferritin zincirleri demirin bağlanabilmesi için çekirdek oluştururken, H-ferritin ferrooksidaz aktivitesi ile demirin holoferritine katılmasında görev almaktadır. H-ferritin kalp dokusunda, L-ferritin ise karaciğer dokusunda yoğun olarak bulunur. Hemosiderin ise ferritin yıkım ürünleri ve demir oksit kümelerinden oluşmaktadır. Ferritin içinde depolanmış olan demir biyolojik olarak kullanıma hazırdır ve gerektiğinde mobilize edilir. Demir içeriği tükenen ferritin ise lizozomal veya proteozomal degradasyona uğrar. Serum ferritini, L-ferritinin dolaşımdaki glikozillenmiş bir izoformudur. Çok az miktarda Fe^{3+} taşır, depolama veya metabolik görevi yoktur. Vücut demir depolarını gösteren klinik belirteç olarak kullanılır. Labil demir havuzu, sitoplazmada geçici olarak bazı düşük molekül ağırlıklı yapılara (şelatörler) bağlı olarak bulunan redoks aktif demirdir. Sitoplazmik labil demir havuzu, hücrenin demir miktarının bir göstergesidir. Ferritin ve demir şelasyonu yapan ilaçlar sitoplazmadaki labil demir havuzunu azaltarak hücreleri korurlar. Ancak ferritinin aşırı artışı, ferritin içerisinde korunaklı duran demirin potansiyel olarak oksidan hale gelmesiyle sonuçlanabilir [9].

2.2. DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ

2.2.1. Demir Eksikliği Anemisi Tanımı ve Saptanması

Anemi Dünya Sağlık Örgütü'ne göre; Hemoglobinin (Hb), 15 yaşından büyük erkekte 13 g/dL'nin, 15 yaşından büyük ve gebe olmayan kadında 12 g/dL'nin, gebelerde ise 11 g/dL'nin altı olarak tanımlanır. Demir eksikliği anemisi önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada en sık gözlenen anemi türü demir eksikliği

anemisidir. En sık çocuklarda ve doğurganlık çağındaki kadınlarda izlenir. Gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülür.

Demir eksikliğinde (DE) iki aşama vardır; ilk aşamada vücudun toplam demiri azalmıştır, henüz anemi yoktur. İkinci aşamada demir eksikliğinin eritropoezi azaltması sonucu anemi gelişmiştir. DEA, hemoglobinopati veya kronik bir hastalık yoksa eritrosit mikrositozu, hipokromisi ve düşük ferritin düzeyi ile doğrulanmalıdır. DEA'da Hb düzeyi kaç olursa olsun sebep araştırılmalıdır. Menopoz sonrası kadınlarda ve erkeklerde DEA genellikle kan kaybına sekonder gelişir. Bu hastalarda gastrointestinal sistem kanamaları bütün sebeplerin 1/3'ünü oluşturur.

Demir eksikliğinin laboratuvar bulgularında düşük Hb ve hematokrit, düşük eritrosit sayısı, düşük mutlak retikülosit sayısı bulunur. Eritrosit sayısı talasemilerde artabilirken demir eksikliğinde düşüktür. Trombosit sayısı eritropoetinin platelet öncüllerini aktive etmesine bağlı olarak artabilir. Hipokromi, mikrositoz, anizositoz DEA'nin periferik yayma bulgularıdır. Mikrositoz ve hipokromi kronik hastalık, B12 vitamini ve folat eksikliğinin olmadığı durumlarda DEA için duyarlı göstergelerdir. Mikrositoz ve hipokromi birçok hemoglobinopatinin de periferik yayma bulgusudur.

DE'nin serum belirteçleri düşük ferritin, düşük demir, artmış total demir bağlama kapasitesi, artmış eritrosit protoporfirini ve artmış transferrin bağlayan reseptörlerdir. Ferritin DE'yi gösteren en güçlü testtir. Tanısı için sınır değeri 12-15 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu değer eşlik eden hastalık yoksa geçerlidir. Kronik hastalık anemisi olan ve/veya inflamasyon durumlarında demir eksikligi, ferritin düzeyinin <100 µg/L olmasi veya ferritin düzeyi 100-299 µg/L arasinda ise transferin satürasyonun < %20 olması olarak tanımlanır [32].

2.2.2. Demir Eksikliği Anemisinin Nedenleri

Demir eksikliğinin nedenleri Tablo 1 ‘de gösterilmiştir [32].

Tablo 1. Demir Eksikliği Anemisinin Nedenleri

Diyetle yetersiz alım	Kan kayıpları	Azalmış demir emilimi	Genetik nedenler
•Malnütrisyona sebep olan yetersiz beslenme durumları	•Travmaya bağlı kanama •Menoraji •Hemoptizi •Hematemez ve melena •Hematüri •Gebelik ve doğum •Laktasyon •Sık kan bağışı •Farkedilmeyen kanamalar: özellikle gastrointestinal sistem kaynaklı (okült,gastrit,telenjiektazi) •Gastrointestinal paraziter enfeksiyonlar	•Atrofik gastrit •Helikobacter pylori enfeksiyonu •Obezite cerrahisi	•TMPRSS6 mutasyonuna bağlı IRIDA (Iron refractory iron deficiency anemia: Demire refrakter DEA). •SLC11A2 mutasyonu: Divalan metal taşıyıcısında meydana gelen mutasyon

2.2.3. Demir Eksikliği Anemisinde Klinik

Demir eksikliği anemisinin kliniği; aneminin süresine, şiddetine, hastanın yaşına, ek hastalık varlığına ve başlangıç hızına bağlıdır. Bazen hastalar asemptomatik olabilir, laboratuvar tetkikleriyle tanı konabilir.

DEA’nın tanısı konulurken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Anamnezde diyet, pika öyküsü, antikoagülan, antiagregan ve NSAİ ilaçların kullanım durumu sorgulanmalıdır. Eğer bu ilaçların kullanımının klinik endikasyonu zayıf ise kesilmeli veya başka tedavilere geçiş düşünülmelidir. Ailede DEA öyküsü olması durumunda herediter demir emilim bozukluğu, hemostaz bozukluğu ve talasemi ayırıcı tanıda akılda bulundurulmalıdır. Ayrıca kan donörü olma öyküsü de sorgulanmalıdır [32].

Hastaların başvuru semptomları arasında; yorgunluk, güçsüzlük, baş ağrısı, baş dönmesi, egzersiz intoleransı, nefes darlığı, göğüs ağrısı, pika, huzursuz bacak sendromu vardır. Bu semptomlar daha çok anemik hastalarda olmakla beraber depo demirinin ciddi düşüklüğünde de ortaya çıkabilir [32].

Hastaların muayenesinde solukluk, tırnaklarda kırılganlık, saç dökülmesi, dilde atrofi saptanabilir. Hastalarda disfaji halsizlik yorgunluk, nevralji vazomotor rahatsızlıklar uyuşma karıncalanma görülebilir [32].

2.2.4. Demir Eksikliği Anemisinde Tanı ve Ayırıcı Tanı

Demir eksikliği anemisi sık karşılaştığımız ve tanısını çoğunlukla kolayca koyabildiğimiz bir bozukluktur. Tam kan sayımı, serum demiri, transferrin, transferrin satürasyonu, ferritin, periferik yayma parametreleri ve kemik iliği incelemesi tanıda kullanılan çalışmalardır.

Komplike olmamış DEA'da serum demiri, transferrin saturasyonu (TS), ferritin ve kemik iligi demir deposu azalmıştır. Total demir bağlama kapasitesi (TDBK), sTfR, sTfR/ferritin indeksi, eritrosit çinko protoporfirin artmıştır [32, 33, 34, 35].

Periferik yaymada gördüğümüz tipik bulgular ise hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazidir. Hipokromi hemoglobin yapım azlığına bağlı olarak eritrositlerdeki ortadaki normal 1/3 soluk alanın daha fazla olması halidir. Kan sayımında eşdeğeri MCH (mean corpuscular hemoglobine- ortalama eritrosit hemoglobini)' dir. Mikrositoz ise küçük hacimli eritrositlerdir ve kan sayımındaki eşdeğeri MCV'dir. Hipokrom mikrositer anemi (düşük MCH ve MCV) DEA için tipik bulgudur. Anizositoz erken görülebilecek morfolojik değişikliktir ve farklı büyüklüklerde eritrosit varlığını gösterir. Kan sayımındaki eşdeğeri RDW (red cell distribution width)'dir. Erken dönemde hem normal hacimde hem de azalmış demire bağlı küçük hacimlerde eritrosit yapıldığı için anizositoz görülüp RDW (>%15) artacaktır. İlerleyen dönemlerde ise demir yokluğundan tek tip eritrositler yapılmaya ve anizositoz kaybolup, RDW azalmaya başlayacaktır. Yine demir tedavisi sonrası ya da transfüzyon sonrasında ortamda normal hacimli eritrositlerin bulunmaya başlamasıyla anizositoz, RDW artışı görülebilir. Periferik yaymada hedef hücreleri, kalem hücreleri, gözyaşı hücreleri görülmesi poikilositoz (eritrosit şekil farklılıkları)

olarak ifade edilir ve DEA 'da sık görülür. Polikromazi ise eritrositlerin farklı renklerde boyanmasıdır, retikülositozu temsil eder ve DEA tedavi sonrası ve transfüzyon sonrası görülebilir. Uzun süren DEA' de lökopeni, artmış eritropoetine ikincil olarak gelişebilen trombositoz da karşılaşılabilecek durumlar arasındadır [32, 33, 34, 35].

Serum Demiri: Plazma ve tercihen serumdan bakılır. Çoğunluğunu transferrine bağlı demir oluşturur DEA'de düşük bulunur. Diyet ile değişiklik göstermesi, diurnal ritminin olması ve kronik hastalık anemisinde de düşük bulunması tanı koydurucu özelliğini azaltmaktadır. Diyet ile alınan günlük demir miktarı 15 mg kadardır ve bunun ancak %10'u yani 1,5 mg plazmaya geçebilmektedir. Eritropoez için gereken günlük demir miktarı ise 20-25 mgdir. Çünkü her gün eritrositlerin (toplamda 2000 ml) %1'i yani 20 ml'si (=20 mg) retiküloendotelyal makrofajlar tarafından fagosite edilir. Böyle büyük miktarda gerekli olan demir ancak fagosite eritrositlerdeki demirin tekrar kullanıma girmesi ile sağlanabilir [33].

Transferrin: Plazmada demiri taşıyan proteindir. DEA' de artar. Bunun sebebi dokuların demir ihtiyacının artmış olmasıdır. Azalan demiri yakalayabilmek için vücut adaptasyonel olarak sayısını artırır. Ölçülen Tf konsantrasyonunun 1,389 ile çarpılması sonucu elde edilen değer bize total demir bağama kapasitesini (TDBK) verir. Yani diğer bir deyişle TDBK dolaşımdaki transferrinin fonksiyonel ölçümüdür [35].

Transferrin Satürasyonu: Plazma demir değerinin TDBK'ne bölünmesiyle elde edilen değerdir (Fe/TDBK X100=TS). Demir eksikliği anemisinde demirin düşmesi ve TDBK'nin artması sonucu TS düşük beklenir. Normal aralığı, %25-45'dir. Demir eksikliği düşünmemiz gereken sınır %16'dır. Demir eksikliği anemisinde çoğunlukla %10 'nun altındadır. DEA'ne inflamasyon gibi komorbiditelerin eşlik ettiği durumlarda ise TS < %20 bulabiliriz. TS tanı açısından faydalı bir parametre olmakla birlikte tek başına tanı koydurucu değildir [34, 35].

Ferritin: Depo demirinden biridir. Komorbit faktörlerin eşlik etmediği DEA'da tek başına yeterli bir parametredir. Pozitif akut faz reaktanı olması, enfeksiyon inflamasyon, malignite, karaciğer hastalığı ve kalp yetmezliği durumlarında demir durumundan bağımsız artış göstermesi spesifikliğini azaltmaktadır. Serum ferritin değerinin 15 ng/ml altında olmasının DEA için spesifitesi %99, sensitivitesi %59' dur.

Bu yüzden normal-yüksek ferritin değeri DEA' yı dışlamak için tek başına yetmez [34]. DEA'ya inflamasyonun eşlik ettiği durumlarda yüksek ferritin değeri için belirlenmiş bir sınır değer yoktur, > 50 ng/ml ferritin değerleri DEA'yı dışlayamaz [35]. Ferritin kronik inflamasyonda ve kronik renal yetmezlikte 100 ng/ml [36, 37], hemodiyaliz hastalarinda 200 ng/ml, kalp yetmezliği bulunan hastalarda 300 ng/ml'ye kadar yükselebilmektedir [38]. Bu karmaşık durumu biraz daha basitleştirmek adına DEA tanısı komorbiditesi olmayan hastalarda ferritin <15 ng/ml, TS %16 ve komorbiditesi olan hastalarda ise ferritin < 41 ng/ml, TS <%20 değerleri ile net olarak konulabilir. İnflamasyonla birlikte ferritin > 50 ng/ml olması durumunda TS, sTfR ve kemik iliği depo demiri bakma gibi ek testlerle DEA tanısını koyabiliriz [34, 35, 36, 37, 38].

Soluble Transferrin Reseptörleri (sTfR): Serumda dolaşan transferrin reseptörlerinin göstergesidir. Bu reseptörlerin kaynağı eritrosit prekürsörlerinin membranıdır. Eritropoez ne kadar çok artarsa serbest soluble transferrin reseptörleri de o miktarda artar. DE'de eritropoez uyarıldığı için sTfR miktarını da yüksek olarak karşımıza çıkacaktır. Rutin pratikte kullanmadığımız bu test ayırıcı tanıda zorlandığımız vakalarda tercih edilebilecek bir tanı testidir. Değerlendirme sırasında hemolizden ve eritropoetin gibi ajanlardan etkilendiği akılda tutulmalıdır [34].

Kemik iliği depo demiri: Tanıda altın standarttır. Dekalsifikasyon sırasında eriyip kaybolan ferritin yerine hemosiderin depo demiri olarak kullanılır. Prusya mavisi ile eritroid öncüllerde ve kemik iliği makrofajlarında boyanma olmaması DEA için tipik tanı koydurucu bulgudur. İnflamasyondan etkilenmemesi ve yüksek spesifitesi olumlu taraflarıdır. İnvaziv bir işlem olması, değerlendirmek için tecrübe gerektirmesi ve eritropoetik ajanlardan etkilenmesi nedeniyle seçili vakalarda kullanılan bir yaklaşımdır [34].

2.2.4.1. Demir eksikliği anemisinde ayırıcı tanı

Hipokrom mikrositer anemi yapan tüm sebepler demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısına girer. Depo demir düzeyleri bu ayrımda temel parametredir. Depo demirinin azaldığı tek mikrositer anemi DEA'dır. Ayırıcı tanıya giren diğer tüm anemilerde demir depoları normal-yüksek olarak bulunur. Depo demir miktarını gösteren parametre ferritindir. Düşük ferritin, komorbid faktörlerin eşlik etmediği DEA' da tek

başına tanı için yeterlidir. Serum ferritin değerinin 15 ng/ml altında olmasının DEA açısından %99 spesifite, %59 sensitivite değeri vardır [34]. Ancak pozitif akut faz reaktanı olarak ferritinin arttığı durumlarda TS, sTfR vb. ek tetkikler ile DEA tanısı konulmaya çalışılır.

Tablo 2. Demir Eksikliği Anemisinde Ayırıcı Tanı

	DEA	**KHA**	**DEA+KHA**
Serum ferritini	Düşük	Yüksek	Düşük veya Normal
Serum demiri	Düşük	Düşük	Düşük
Demir bağlama kapasitesi	Yüksek	Yüksek	Düşük veya Normal
Transferrin satürasyonu	Düşük	Düşük veya Normal	Düşük

DEA: Demir eksikliği anemisi, KHA: Kronik Hastalık Anemisi

2.2.5. Demir Eksikliği Anemisinde Tedavi

Demir eksikliği anemisi önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu nedenle DEA veya DE, semptom gösterip göstermediğine bakılmaksızın tespit edildiği anda tedavi edilmelidir. Tedavi demir replasmanı yapılmasından ziyade multidisipliner bir klinik yaklaşımı gerektirir. DE'nin sebebi mutlaka araştırılmalıdır. Erkeklerde ve postmenapozal kadınlarda saptanan demir eksikliği gastrointestinal sistem kaynaklı bir malignite açısından uyarıcı olmalı ve buna yönelik tetkikler yapılmalıdır.

Hemoglobin değerleri çok düşük olan semptomatik hastalarda veya ciddi kardiyopulmoner hastalığı olanlarda eritrosit transfüzyonu tedavide ilk basamak olarak düşünülmelidir. Aneminin şiddeti, süresi, hasta yaşı, klinik hikâyesi tedavinin oral veya parenteral olmasını belirler.

2.2.5.1. Oral demir tedavisi

Yetişkin hastalarda tedavi için gereken günlük doz 180-200 mg elementer demirdir. Ancak tedavi hastanın yaşına ferritin düzeyine, semptomların şiddetine ve gastrointestinal yan etkilere göre 100-200 mg arasında değişebilir [32].

Demire intolerans sık görülür. Oral demir preparatları kabızlık, ishal bulantı, kusma, hazımsızlık gibi yan etkilere neden olabilir.

Oral demir tedavisinde Ferröz (+2) formdaki tuz ya da kompleksleri içeren ilaçlar ya da ferrik (+3) formdaki kompleksleri içeren ilaçlar kullanılabilir. Bu demir kompleksleri sülfat, demir fumarat ve demir glukonat olabilir.

DEA saptandığında tedaviye hemen başlanmalı, altta yatan neden araştırılmalıdır. Oral demir tedavisi ile Hb 2-4 hafta içinde 1-2 g/dL artar. Bu nedenle tedavinin başlanmasından 2-4 hafta sonra bir kan sayımı yapılmalıdır. Uygun dozda tedavi verilmiş ve altta yatan neden düzeltilmiş ise anemi 2-4 ay içinde düzelecektir. Hb normalleştikten sonra demir depolarını doldurmak için 3-6 ay daha tedaviye devam edilmelidir. Sonraki takipler aneminin şiddetine, altta yatan nedenlere ve hastanın klinik durumuna göre değişir [32].

Sık ve yüksek doz demir tedavisinin dolaşımdaki hepsidin seviyelerini arttırarak fraksiyonel demir emilimini azalttığı, daha az sıklıkla ve daha düşük dozlarda verildiğinde emilimin arttığını öne süren çalışmalar vardır.

2.2.5.2 Parenteral demir tedavisi

Daha güvenli ve maliyet etkin olduğundan oral demir tedavisi parenteral demir tedavisine tercih edilmelidir. Etkin, ucuz, kolay ulaşılabilir ve güvenilir olması oral demir tedavisinin öne çıkan özellikleridir [32].

Fakat bazı durumlarda parenteral tedavi etkili bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Türk Hematoloji Derneğinin kılavuzuna göre belirlenen parenteral tedavi endikasyonları tablo 3'de gösterildi [32].

Parenteral tedavi, intravenöz veye intramusküler yolla yapılabilir. Her iki uygulamada da allerjik yan etkilerin olabileceği unutulmamalıdır. Toplam demir dozu aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

Toplam demir dozu (mg)= ağırlık (kg) x (Normal- hasta hemoglobin farkı) x 2,4 + 500

Toplam tedavi dozu günlere bölünerek veya tek seferde verilebilir. Parenteral demir tedavisinde sistemik yan etkiler görülebilir. Erken dönemde; hipertansiyon, hipotansiyon, göğüs ağrısı, kas krampları, ürtiker, ateş, diyare bulantı, kusma, anafilaksi olabilir. Geç dönem yan etkileri arasında lenfadenopati, miyalji, artralji ve ateş vardır [32].

Tablo 3. Parenteral Tedavi Endikasyonları

Hastanın oral demir tedavisine uyumu olmaması veya tolere edememesi
Kan kaybının devam etmesi
Aneminin ciddi olması
Gastrointestinal sistem hastalığın alevlenmesi (ülseratif kolit)
Demir emilim bozukluğu
Hemodiyaliz hastaları
İşlevsel demir eksikliği (eritropoetin tedavisinde olan böbrek hastası, malignite hastası, otolog kan transfüzyonu adayı)

2.3. GHRELİN

Ghrelin, 1999'da büyüme hormonu salgılatıcı-reseptörünün (GHS-R) endojen ligandı olarak keşfedilen bir peptit hormondur [39]. Ghrelinin serin-3'ü, GOAT (Ghrelin O-Asiltransferaz, politopik zara bağlı bir enzim) tarafından sekiz karbonlu bir yağ asidi (oktanoat) ile açillenir [40]. Ghrelin üreten hücreler, mide mukozası boyunca ve daha az ölçüde ince bağırsak ve endokrin pankreasta dağılmış ayrı bir endokrin hücre grubu oluşturur [2].

Ghrelin plazma seviyeleri, açlık ve kronik kalori kısıtlaması sırasında gıda alımını ve yağ depolanmasını uyarmak ve kan şekerinde yaşamı tehdit eden düşüşleri önlemek için yükselir. Plazma ghrelin seviyeleri yemek yendikten sonra ve enerji fazlası durumlarında (obezite gibi) düşer. Ghrelin, iştah ve enerji homeostazının düzenlenmesinde kilit bir rol oynar. Ghrelin bu işlevleri, iştah düzenleyici nöronlarda ve endokrin pankreas dahil periferik metabolik organlarda ghrelin reseptörü GHS-R'ye bağlanarak gerçekleştirir. Ghrelin seviyeleri, beden kitle indeksi (BKİ) ve insülin direnci ile negatif ilişkilidir [2].

Demir eksikliği anemisi olan çocukların plazmasındaki ghrelin ile demir ve hepsidin seviyeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur ve ghrelinin demir metabolizmasını etkileyebileceğini düşündürmüştür [4]. Ghrelin açlık sırasında iştahı artırır ve gıda alımını uyarır. İştahsızlık ise DEA'nın iyi bilinen klinik özelliklerinden biridir ve ghrelin azalmasından kaynaklanabilir. DEA bir açlık durumudur. DEA'nın üç farklı evresinde de (hipoferritinemi/DE/DEA) hem ghrelin hem de plazma demir

içeriğinin azaldığı, DEA evresinde olan çocuklarda ise en düşük seviyelere ulaştığı gösterilmiştir. Ayrıca plazmada bu iki parametre arasında anlamlı bir pozitif korelasyon saptanmıştır [41]. Başka bir çalışmada DEA'lı prepubertal çocuklarda hem ghrelin hem de demir düzeylerinin kontrollere göre önemli ölçüde düşük olduğunu gösterilmiştir [42]. Yapılan bir çalışma, sistemik demir homeostazının temel düzenleyicisi olan hepsidin ve serumdaki ghrelinin, DEA'lı çocuklarda hem tedavi öncesi seviyelere hem de sağlıklı çocuklara kıyasla demir tedavisi ile arttığını göstermiştir [43]. 2018 yılında Lou Q. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada açlığın Ghrelin/GHSR/ MAPK sinyal yolu aracılığı ile ferroportin üzerine etkisinin olduğu bulunmuştur [4]. Yapılan bu tüm çalışmalar demir eksikliği anemisi ile ghrelin arasında ilişki olduğunu düşündürmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA ŞEKLİ VE TÜRÜ

Çalışmamız, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları ve Hematoloji polikliniklerine başvuran hastalarda prospektif kesitsel olarak gerçekleştirildi. 02.09.2021 tarihli ve 13/4 karar no' lu etik kurul onayı alındıktan sonra çalışmamız 03.09.2021-30.09.2022 tarihleri arasında planlandı. Çalışmaya katılan her bir gönüllü çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onam formu alındı.

3.2. OLGU SEÇİMİ

Araştırmaya dâhil edilme kriterleri hasta grubu için aşağıda belirtilen şekildedir:

- Gönüllü olarak araştırmaya katılmayı kabul etmek ve yazılı onam vermek
- Kadın cinsiyet olmak
- 18-50 yaş arasında olmak
- Menopozda olmamak
- Demir eksikliği anemisi tanısı almak
- Ek hastalık öyküsü olmamak
- Enfeksiyonu olmamak
- Beden Kitle İndeksi 19-25 arasında olmak
- Demir tedavisi almamak

Araştırmaya dâhil edilmeme kriterleri aşağıda belirtilen şekildedir:

- Araştırmaya katılmayı kabul etmemek ve yazılı onam vermemek
- 18 yaşından küçük 50 yaşından büyük olmak
- Erkek cinsiyet
- Kronik bilinen herhangi bir hastalığı olmak

- Enfeksiyonu / İnflamasyonu olmak
- Gebelik ve laktasyon döneminde olmak
- Enfeksiyonu / İnflamasyonu olmak
- Demir tedavisi alıyor olmak

Kontrol grubu için dahil edilme kriterleri aşağıda belirtildiği gibidir:

- Gönüllü olarak araştırmaya katılmayı kabul etmek ve yazılı onay vermek
- Kadın cinsiyet olmak
- 18-50 yaş arasında olmak
- Menopozda olmamak
- Ek hastalık öyküsü olmamak
- Enfeksiyonu olmamak
- Demir eksikliği ve demir eksikliği anemisi olmamak
- Beden Kitle İndeksi 19-25 arasında olmak

Örneklem büyüğü ve istatistiksel güç analizi G.POWER: Statistical Power Analyses for Windows V.3.1 ile yapıldı. Çalışma öncesi yapılan güç analizine göre % 5 tip I hata ve minimum 95 güç ile demir eksikliği anemisi hasta grubunda en az denek sayısı 28 hesaplandı. Hesaplamalar yapılırken literatürde yer alan çalışmadan referans alındı [44].

Demir eksikliği anemisinin tanısı için Türk Hematoloji Derneği Erişkinde Demir Eksikliği Anemisi Tanı ve Tedavi Kılavuzundaki kriterler baz alınarak hemoglobin <12 g/dL, ferritin <15 µg/L olan ve anemi için başka bir sebep düşünülmeyen hastalar DEA olarak kabul edildi. Diğer anemi sebepleri dışlandı. Böylece demir metabolizmasını etkileyebilecek inflamatuar ve otoimmün süreçlerin etkisi önlenmiş oldu. Gönüller benzer yaş gruplarından seçilerek yaşa bağlı demir metabolizması farklılıklarının önüne geçildi. Çalışmaya katılan gönüllüler kadın cinsiyet olarak seçildi. Böylece cinsiyete bağlı farklılıklar ekarte edilmiş oldu. Çalışma için uygun 50 DEA hastasından ve 40 sağlıklı gönüllüden onamları alındı. Sonrasında yaş, cinsiyet, boy, kilo, BKİ ve ek hastalıkları gibi bilgileri not edildi. Kan örnekleri

alındı. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarının beden kitle indeksi kg/m2 formülüne göre hesaplandı.

3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Hasta ve kontrol grubundan polikliniklere başvuru sırasında 10-12 saat açlık sonrası sabah venöz kan örnekleri alındı.

Dahil edilme kriterlerini karşılayan hastalarda tam kan sayımı parametreleri (Hemoglobin, MCV, MCH, RDW, WBC, Platelet) ferritin, serum demiri, transferrin, TS, TDBK hastanemiz laboratuvarında aynı gün çalışıldı. Hemogram testi için K3-EDTA içeren 2.0 mL hacimli vakumlu tüpler(Isotherm Co. Ltd.Türkiye) kullanıldı. Hemogram ölçümü XN 1000 oto-analizörü (Sysmex Corp. Japonya) ile ticari olarak mevcut olan kitler kullanılarak çalışıldı. Ghrelin, HIF-2α, hepsidin ve biyokimya parametreleri için 5.0 mL hacimli jelli pıhtı aktivatörlü tüpler (Isotherm Co. Ltd.Türkiye) kullanıldı. Demir, total demir bağlama kapasitesi, doymamış demir bağlama kapasitesi düzeylerinin ölçümü tam otomatik bir AU 5800 analizörü (Beckman CoulterInc.ABD) ile ticari olarak mevcut olan kitler kullanıldı. Ferritin düzeylerinin ölçümü tam otomatik DxI 800 analizöründe (Beckman CoulterInc.ABD) kemilüminesans olarak gerçekleştirildi.

Hepsidin, Ghrelin HIF-2α seviyeleri için alınan kan numuneleri 6-7 kez alt-üst edildi. Oda sıcaklığında pıhtılaşması için 20 dk bekletildi. Sonrasında 4000 rpm'de (RCF=2862 x g) soğutmalı santrifüj cihazında (NF 1200®, Nüve San. Malz. A.Ş. Ankara, Türkiye) 10 dakika santrifüj edildi. İkterik, lipemik ve hemolizli numuneler çalışma dışı bırakıldı. Elde edilen serumun bir kısmı ghrelin, HIF-2α ve hepsidin ölçümlerinde kullanılmak için ependorf tüplere ayrıldı. Çalışma gününe kadar -20 °C buzdolabına kaldırıldı. Tüm gönüllülerin ayrılan serumları ghrelin, hepsidin ve HIF-2α düzeyini belirlemek üzere çalışma gününde oda ısısında çözdürülerek çalışıldı.

Ghrelin testinin ölçümünde yarışmalı immunoassay tekniği kullanıldı. Ghrelin düzeyi ölçümünde, SunRed Human Ghrelin ELISA kiti (Katalog No:201-12-558) kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 30-9000 pg/mL, analitik duyarlılığı 28.225pg/mL idi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi.

HIF-2α düzeyi ölçümünde ELISA tekniği kullanıldı. HIF-2α düzeyi ölçümünde SunRed Human HIF-2α ELISA Kit (Katalog No:201-12-2503) kullanıldı.

Hepsidin ölçümünde yarışmalı immunoassay tekniği kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 0.05-12 ng/mL, analitik duyarlılığı 0.038 ng/mL idi. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi.

Hepsidin düzeyi ölçümünde SunRed Human Hepc ELISA Kit (Katalog No:201-12-120) kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 7 -1500ng/mL, analitik duyarlılığı 5.23ng/mL idi. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi.

3.3. İSTATİKSEL ANALİZ

Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için frekans (n) ve yüzde (%), sürekli değişkenler için ortalama, standart sapma (SS), medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR: 25-75.persentil) değerleri ile gösterildi. Verilerin normal dağılım varsayımına uygunluğu Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Kontrol ve hasta grubunun sürekli değişkenlerinin parametrik olmayan karşılaştırmasında Mann-Whitney U test, parametrik karşılaştırılmasında Independent t-test kullanıldı. Demir eksikliği anemisinin belirlenmesinde hastaları hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeylerine göre ayırt etmek ve kesim noktası belirlemek için ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi yapıldı ve analiz sonuçları Eğri Altında Kalan Alan (AUC), kesim (cut-off) noktaları, duyarlılık ve seçicilik değerleri ve %95 güven aralıkları ile sunuldu. Tüm parametreler için optimal kesim noktası Youden indeks ile hesaplandı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon testleri ile incelendi. Analizler IBM SPSS 23.0 paket programı (IBM Corp. Armonk, NY) ile yapıldı ve 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya kontrol grubu için 40 ve demir eksikliği anemisi olan hasta grubu için 50 kişi olmak üzere toplam 90 kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda yer alan kişilerin cinsiyeti kadındı. Kontrol grubunun medyan yaşı 29 (IQR: 27-35) ve hasta grubunun medyan yaşı 35 (IQR: 22-42) yıldı. İki grubun yaş (p=0,211), boy (p=0,497), kilo (p=0,770) ve BKİ (p=0,964) değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu. Tablo 4'te çalışmaya dahil edilen hastaların genel özellikleri sunuldu.

Tablo 4. Demografik Özellikler

	Kontrol (n=40)		Hasta (n=50)		
Değişkenler	**Ort±SS**	**Medyan(IQR)**	**Ort±SS**	**Medyan(IQR)**	**p**
Yaş	31,07±5,95	29(27-35)	33,8±10,39	35(22-42)	0,211[1]
Boy	1,64±0,06	1,63(1,6-1,67)	1,65±0,07	1,65(1,59-1,7)	0,497[2]
Kilo	61,55±10,36	60,5(54,5-65)	60,92±8,15	61(54-68)	0,770[1]
BKİ	22,92±3,48	21,81(20,95-24,19)	22,47±2,82	22,26(20,7-24,38)	0,964[1]

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, IQR:25-75. persentil. [1]Mann-Whitney U test. [2]Independent t-test.

Tablo 5'te hasta ve kontrol gruplarının hemoglobin ve ferritin değeri gösterildi. Hasta grubunun ferritin değeri 3 [IQR: 2-5] ve kontrol grubunun ferritin değeri 20,5 [IQR: 16-32,5] idi. Hasta grubunun hemoglobin değeri 9,77±1,48 ve kontrol grubunun hemoglobin değeri 13,35±0,71 idi. Hasta grubunda hemoglobin ve ferritin değeri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük izlendi (p<0,001).

Tablo 5. Hasta ve Kontrol Grubunun Hemoglobin ve Ferritin Değerleri

	Kontrol (n=40)		Hasta (n=50)		
Değişkenler	**Ort±SS**	**Medyan(IQR)**	**Ort±SS**	**Medyan(IQR)**	**p**
Ferritin	30,95±30,87	20,5(16-32,5)	3,87±2,53	3(2-5)	**<0,001[1]**
Hemoglobin	13,35±0,71	13,35(12,75-13,9)	9,77±1,48	10,05(8,6-10,8)	**<0,001[2]**

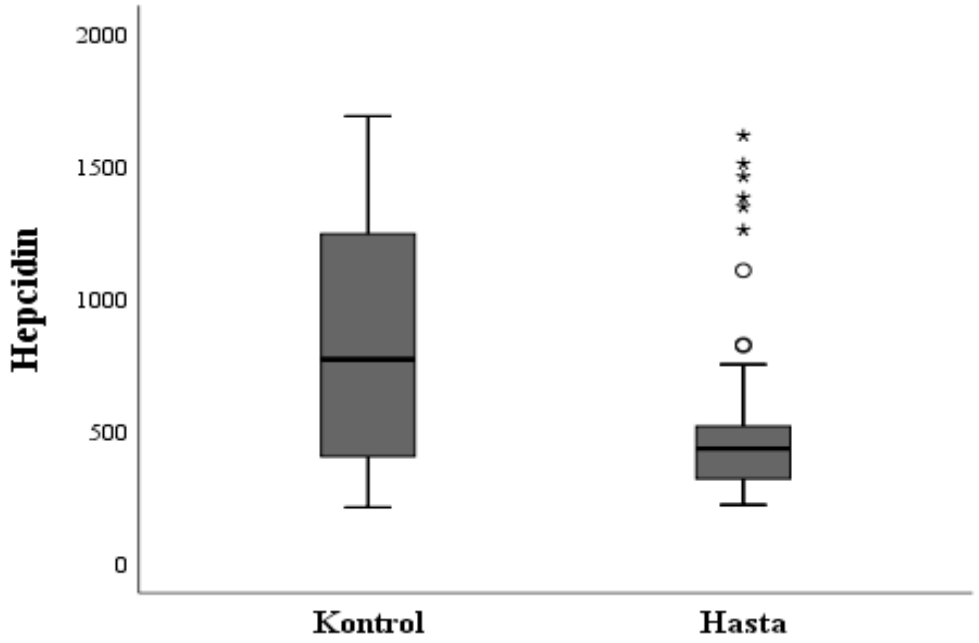
*Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, IQR:25-75. persentil. [1]Mann-Whitney U test. [2]Independent t-test.

Kontrol ve hasta grubunun hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyleri Tablo 6'da gösterildi. Hasta grubunda medyan hepsidin değeri 434,56 (IQR: 320,9-519,23) ve kontrol grubunda medyan hepsidin değeri 772,63 (IQR: 405,24-1246,98) olup, hasta grubunda hepsidin değerlerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptandı (p=0,002). İki grubunda HIF-2α değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (p=0,199). Hasta grubunun medyan ghrelin düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü (2111,3 [IQR: 1848,26-3249,59] ve 4215,62 [IQR: 2493,06-5911,4]; p<0,001).

Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubunun Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri

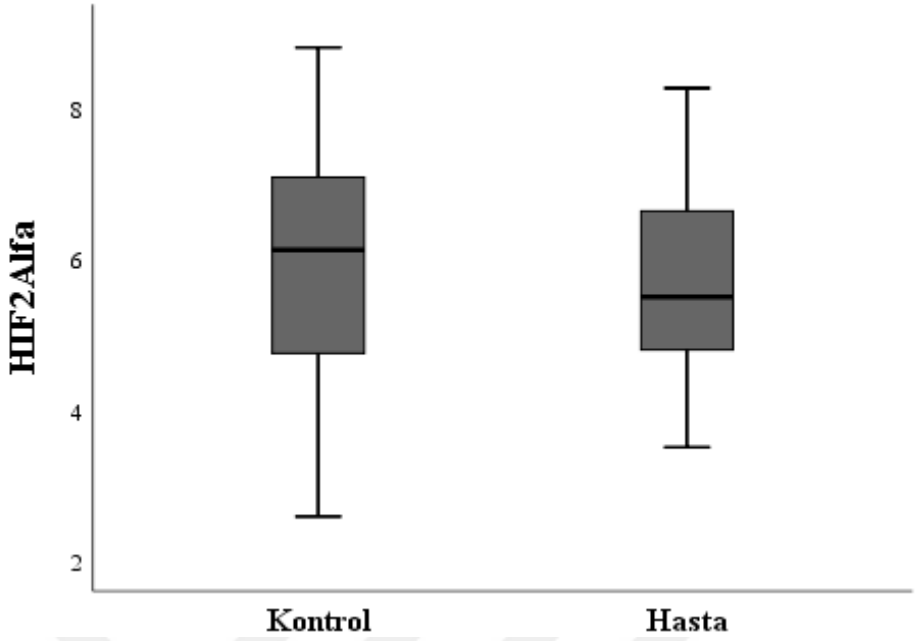
Değişkenler	Kontrol (n=40)	Hasta (n=50)	p
Hepsidin			
Ort±SS	851,12±467,14	549,74±369,92	**0,002**[1]
Medyan(IQR)	772,63(405,24-1246,98)	434,56(320,9-519,23)	
HIF-2α			
Ort±SS	6,02±1,5	5,64±1,23	0,199[2]
Medyan(IQR)	6,14(4,77-7,1)	5,51(4,81-6,65)	
Ghrelin			
Ort±SS	4236,33±1864,99	2761,59±1344,22	**<0,001**[1]
Medyan(IQR)	4215,62(2493,06-5911,4)	2111,3(1848,26-3249,59)	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, IQR:25-75. persentil. [1]Mann-Whitney U test. [2]Independent t-test.



Şekil 2. Çalışma Gruplarının Hepsidin Düzeyleri

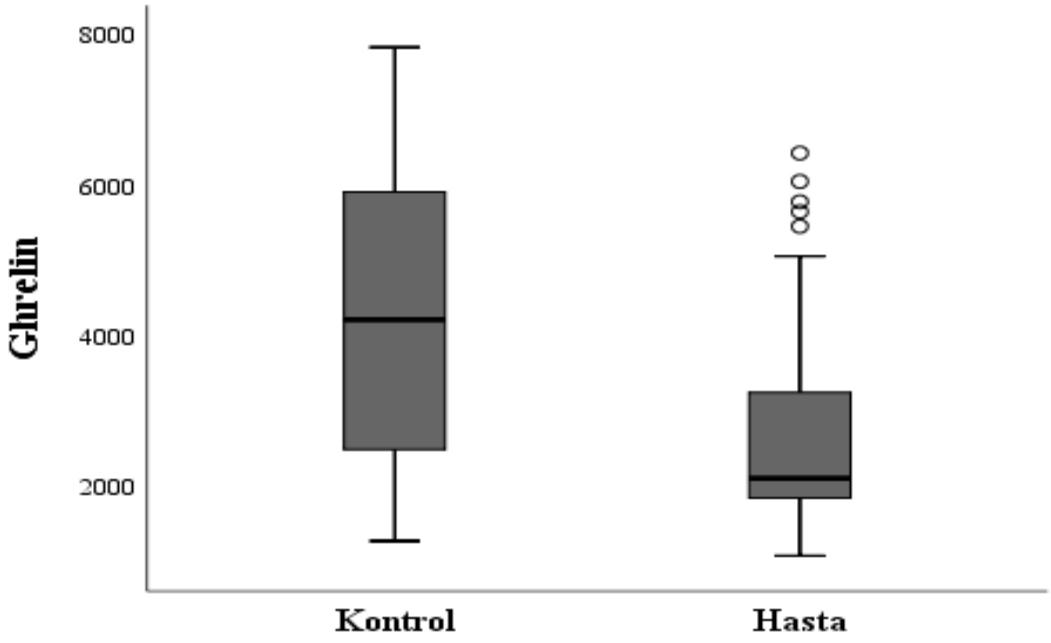
Şekil 2'de kontrol ve hasta grubunun hepsidin düzeylerinin dağılımı gösterildi. Hasta grubundaki kişilerin hepsidin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü (p=0,002).



Şekil 3. Çalışma Gruplarının HIF2α Düzeyleri

Kontrol ve hasta grubunun HIF-2α düzeylerinin dağılımı Şekil 3'de sunuldu. Hasta grubundaki kişilerin HIF-2α düzeyleri kontrol grubundaki kişilerin HIF-2α düzeyleri arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,199).

Şekil 4'te kontrol ve hasta grubunun ghrelin düzeylerinin dağılımı gösterildi. Hasta grubunun ghrelin düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük saptandı (p<0,001).



Şekil 4. Çalışma Gruplarının Ghrelin Düzeyleri

Tablo 7'de kontrol grubundaki kişilerin hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları verildi. Hepsidin-HIF-2α (r=0,728; p<0,001) ve hepsidin-ghrelin düzeyleri (r=0,869; p<0,001) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. HIF-2α ile ghrelin düzeyi (r=0,771; p<0,001) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı.

Tablo 7. Kontrol Grubunda Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Değişkenler (n=40)		**Hepsidin**	**HIF-2α**	**Ghrelin**
Hepsidin	r	1		
	p	-		
HIF-2α	r	0,728	1	
	p	**<0,001**	-	
Ghrelin	r	0,869	0,771	1
	p	**<0,001**	**<0,001**	-

Spearman korelasyon test.

Tablo 8'de demir eksikliği anemisi olan hastaların hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları belirtildi. Hepsidin-HIF-2α (r=0,728; p<0,001) ve hepsidin-ghrelin düzeyleri (r=0,869; p<0,001) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. HIF-2α ile ghrelin düzeyi (r=0,771; p<0,001) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı.

Tablo 8. Hasta Grubunda Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Değişkenler (n=50)		**Hepsidin**	**HIF-2α**	**Ghrelin**
Hepsidin	r	1		
	p	-		
HIF-2α	r	0,746	1	
	p	**<0,001**	-	
Ghrelin	r	0,883	0,747	1
	p	**<0,001**	**<0,001**	-

Spearman korelasyon test.

Kontrol grubundaki hastalarda hemoglobin ve ferritin değerleri ile hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları Tablo 9'da sunuldu.

Tablo 9. Kontrol Grubunda Hemoglobin ve Ferritin Değerleri İle Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

	Hemoglobin		**Ferritin**	
Değişkenler	**r**	**p**	**r**	**p**
Hepsidin	-0,211	0,192[1]	0,089	0,585[1]
HIF-2α	-0,164	0,312[2]	-0,026	0,874[1]
Ghrelin	-0,137	0,398[1]	0,139	0,393[1]

[1]Spearman korelasyon test. [2]Pearson korelasyon test.

Demir eksikliği anemisi bulunan hastalarda hemoglobin ve ferritin değerleri ile hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları Tablo 10'da sunuldu. Hemoglobin ile HIF-2α düzeyi arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon olduğu belirlendi (r=0,412; p=0,003). Demir eksikliği anemisi olan hastaların ferritin değerleri ile HIF-2α düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyona rastlandı (r=0,452; p=0,001). Ferritin ile hepsidin ve ghrelin düzeyi arasındaki pozitif yönde zayıf ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (p=0,164 ve p=0,084).

Tablo 10. Hasta Grubunda Hemoglobin ve Ferritin Değerleri İle Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

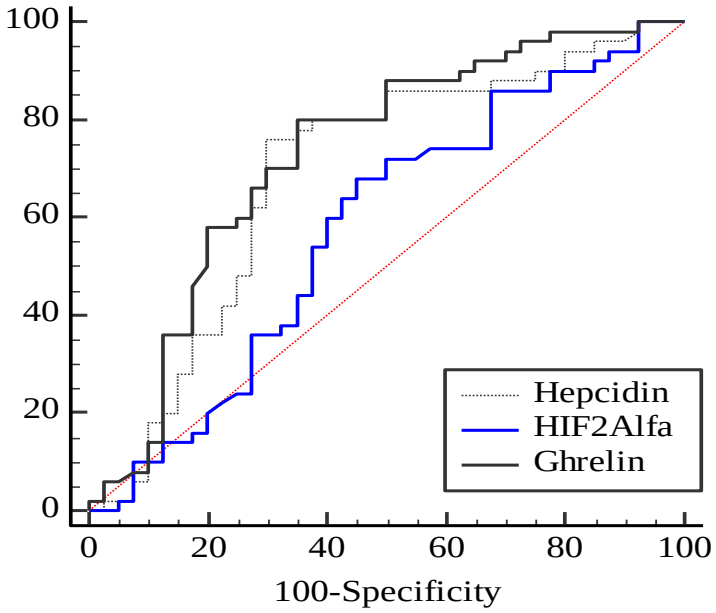
	Hemoglobin		**Ferritin**	
Değişkenler	r	p	r	p
Hepsidin	0,192	0,181[1]	0,200	0,164[1]
HIF-2α	0,412	0,003[2]	0,452	0,001[1]
Ghrelin	0,218	0,128[1]	0,247	0,084[1]

[1]Spearman korelasyon test. [2]Pearson korelasyon test.

Tablo 11'de hastalarda demir eksikliği anemisini ayırt etmede hepsidin, HIF-2α ve ghrelin düzeyi için yapılan ROC analizi sonuçları verildi. Demir eksikliği anemisini belirlemede hepsidin için eğri altında kalan alan (AUC) 0,688 (95%GA: 0,582-0,782; p=0,002), HIF-2α için AUC değeri 0,577 (95%GA: 0,469-0,681; p=0,220) ve ghrelin için AUC değeri 727 (95%GA: 0,623-815; p<0,001) olarak hesaplandı (Şekil 5). Hepsidin ve ghrelin düzeyinin demir eksikliği anemisini belirlemede ayırt edici faktör olduğu görülürken, HIF-2α düzeyinin ise ayırt edici faktör olmadığı belirlendi. Youden indeks ile hepsidin düzeyi için optimal kesim noktası ≤519,228 (Duyarlılık: %76 ve Seçicilik: %70), HIF-2α için ≤5,86 (Duyarlılık:

%68 ve Seçicilik: %55) ve ghrelin için ≤3368,302 (Duyarlılık: %80 ve Seçicilik: %65) olarak bulundu.

Tablo 11. Hastalarda Demir Eksikliği Anemisinin Tahmininde Hepsidin, HIF-2α ve Ghrelin Düzeylerinin Ayırt Edici Performansı



Değişkenler	AUC (%95 GA)	p	Cut-off value	Duyarlılık (%)	Seçicilik (%)
Hepsidin	0,688 (0,582-0,782)	**0,002**	≤519,228	76	70
HIF-2α	0,577 (0,469-0,681)	0,220	≤5,86	68	55
Ghrelin	0,727 (0,623-0,815)	**<0,001**	≤3368,302	80	65

AUC:area under curve, GA:güven aralığı.

Şekil 5. Hepsidin, HIF2α ve Ghrelin Düzeylerinin Demir Eksikliği Anemisi Olan Hastaları Belirlemede Ayırt Edici Performanslarının Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Demir eksikliği dünyadaki en yaygın beslenme bozukluğudur. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde aneminin birinci nedenidir. DEA dünya çapında 1.2 milyardan fazla insanı etkiler. Demir eksikliğinin nedenleri; diyetle azalmış demir alımı, demir absorbsiyonunda azalma ve kan kaybıdır. Demir eksikliği anemisi erişkinlerde; güçsüzlük, halsizlik baş ağrısı, egzersiz intoleransı, yorgunluk, depresyon, pika, huzursuz bacak gibi birçok belirti gösterebilir [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre anemi; hemoglobinin, 15 yaşından büyük erkekte 13 g/dL'nin, 15 yaşından büyük ve gebe olmayan kadında 12 g/dL'nin, gebelerde ise 11 g/dL'nin altı olarak tanımlanır. DE'nin serum göstergeleri düşük ferritin, düşük demir, artmış TDBK, artmış eritrosit protoporfirini ve artmış transferrin bağlayan reseptörlerdir. Serum ferritini DE'yi gösteren en güçlü testtir. Tanı için sınır değeri <12-15 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu değer eşlik eden herhangi bir hastalık yok ise geçerlidir. Kronik Hastalık Anemisi olan ve/veya enflamasyon durumlarında demir eksikliği, ferritin düzeyinin <100 µg/L olmasi veya ferritin düzeyi 100-299 µg/L arasında ise TS< %20 olması olarak tanımlanmaktadır [32, 45].

Çalışmamıza seçilen hasta grubu Türk Hematoloji Derneği Yetişkinde Demir Eksikliği Tanı ve Tedavi Kılavuzu'nda belirtilen demir eksikliği anemisi tanı kriterlerine uygun olarak seçildi. Hasta grubunda ortalama Hb değeri 9,77±1,48 g/dl ve ortalama ferritin değeri 3,87±2,53 µg/L idi. Kontrol grubunun ortalama Hb değeri 13,35±0,71 g/dl ve ortalama ferritin değeri 30,95±30,87 µg/L di. Hasta grubunun Hb ve ferritin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük izlendi ($p<0,001$). Bu bulgular Türk Hematoloji Derneği Yetişkinde Demir Eksikliği Tanı ve Tedavi Klavuzu ile uyumlu idi.

Bilindiği üzere ferroportin-1 molekülü vücudun ihtiyacına göre bağırsak, karaciğer vb dokulardan seruma demir molekülünün salınımı sağlayan proteindir. Ferroportin-1 molekülünün seviyelerinin düzenlenmesinde hepsidin, HIF-2α molekülleri rol almaktadır. HIF-2α molekülleri ferroportinin gen ekspresyonunu artırırken, hepsidin hormonu hücre yüzeyindeki ferroportin molekülüne bağlanmakta ve kompleks halinde hücre içine alınarak ferroportin molekülünün degradasyonuna

neden olmaktadır. Demir metabolizması ile ilgili literatürlerde hepsidin hormonunun serum demir düzeyleri yüksek olduğu dönemlerde arttığı görülür. HIF-2α molekülleri ise özellikle bağırsak hücrelerinde ferroportin molekülünün gen ekspresyonunu arttırarak serum demir düzeylerini arttırmaktadır [6, 9].

Hepsidin çoğunlukla karaciğerden sentezlenir, daha az miktarda böbreklerden, beyinden, iskelet kasından ve kalpten de sentezlendiği gösterilmiştir [46]. Hepsidin, bağırsaklardaki demir emiliminin, makrofajlardaki demir döngüsünün ve hepatik depolardan demir salınımının temel düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır [47]. Diyetsel demir ile hepsidin sentezinin arttığının gözlenmesi, hepsidinin demir metabolizmasında yer aldığını düşündürmüştür. Hepsidin düzeyinin, barsakta demir emiliminin, plasentadan demir taşınmasının ve makrofajlardan demir salımının negatif düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir [48]. Hepsidin bu görevlerinin hepsini yegane reseptörü olan ferroportin üzerinden gerçekleştirir. Hepsidin, ferroportine bağlanıp onun endositozla hücre içine alınıp lizozomal yıkımını sağlar. Böylece, diyetle alınan demirin duodenal enterositlerden, geri dönüşüme giren demirin makrofajlardan ve depolanmış demirin hepatositlerden plazmaya verilmesini önler. Sonuçta demirin plazmaya ve hücre dışı sıvılara geçişi güçlü bir şekilde engellenmiş olur [14, 22]. Anemi hepsidini iki yolla regüle eder. Bunlar, hepsidin gen ekspresyonunu düzenleyen HIF'in yer aldığı doku hipoksisi ve eritropoezi uyararak indirekt olarak hepsidin sentezini baskılayan transferrin doygunluğunun azalmasıdır. Hangi yolla olursa olsun, hepsidin sentezi talasemiler gibi inefektif eritropoezle giden hastalıklara eşlik eden demir yüklenmesine rağmen azalmış olarak bulunur. Bu durum hepsidin üretiminin anemi ile baskılanmasının, hepsidin sentezinin demir yüklenmesi ile uyarılmasına kıyasla daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [49].

Hepsidin ve demir metabolizması arasındaki bağlantıyı gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Dallalio tarafından yapılan çalışmada anemili hastalarda hepsidin ve ferritin arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır [50]. Kemna ve arkadaşlarının 47 katılımcı ile yaptığı çalışmada hepsidin ile demir depoları ve eritropoetik aktivite arasında pozitif korelasyon saptanmıştır [51]. Kaya ve arkadaşlarının demir eksikliği anemisi olan çocuk hasta grubunda yaptıkları çalışmada 15 hastanın bulunduğu grupta serum hepsidin düzeylerinin sağlıklı çocuklara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir [52]. Orhon ve arkadaşlarının 16 demir eksikliği

anemisi olan ve 54 kontrol grubunu içeren çalışmasında ise anemili hasta grubunda kontrol grubuna göre hepsidin düzeyleri düşük bulunmuştur [53]. Doğan ve arkadaşları tarafından yapılan 30 demir eksikliği anemisi olan çocuk ve 28 sağlıklı çocuk ile yapılan araştırmada DEA'li çocukların serum hepsidin seviyeleri sağlıklı çocuklara göre düşük saptanıp tedavi sonrası arttığı gözlemlenmiştir [43]. Düzce Üniversitesinde yapılan bir çalışmada 87 demir eksikliği anemisi ve 50 kontrol grubu alınmış; hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hepsidin düzeyinin demir eksiliği anemili hasta grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [54].

Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde demir eksikliği anemisi ve kontrol grubu kıyaslandığında demir eksikliği anemisi olan grupta kontrol grubuna göre hepsidin seviyesinde anlamlı düşüklük mevcuttu. Hasta grubunda medyan hepsidin değeri 434,56 (IQR: 320,9-519,23) ve kontrol grubunda medyan hepsidin değeri 772,63 (IQR: 405,24-1246,98) olup, hasta grubunda hepsidin değerlerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptandı (p=0,002).

HIF-2α enterosite demir alımında önemli bir role sahiptir. Demirin şelasyonu hücrelerde hem HIF1α hem de HIF-2α'yı aktive ederken, demirden yoksun diyetler farelerin bağırsağında seçici olarak HIF-2α ekspresyonunu indükler [55]. HIF1α, akut hipoksiye yanıt olarak aktive olurken, HIF-2α kronik hipoksi ile ilişkilidir [56]. Duodenal enterositlerde ferroportin üretimi demir ve hipoksi tarafından güçlü bir şekilde düzenlenir. Bunların hepsi demir eksikliği ve anemi sırasında diyet demirinin artan emilimine yöneliktir. Hipoksi, düşük hücresel oksijen durumuna yanıt vermek için genleri transkripsiyonel olarak aktive eden HIF'lerin stabilizasyonu ile etki eder. Demir eksikliği ayrıca HIF'leri stabilize eder, çünkü bozunmaları prolin kalıntılarının demire bağlı hidroksilasyonu ile tetiklenir ve bu nedenle HIF'ler ayrıca demir eksikliği sensörleri olarak işlev görebilir [6]. Enterositlerde HIF aktivasyonunun, hem apikal membranda yer alan Dcytb ve DMT1'in hem de bazolateral membranda yer alan ferroportinin yukarı regülasyonuyla sonuçlandığı gösterilmiştir [57, 58]. Ferroportin geninin promotorü, HIF-2α bağlanması için hedefler olan HIF yanıt elemanlarını (HRE'ler) içerir [57]. Bu nedenle HIF-2α, hipoksi ve demir eksikliği sırasında ferroportin transkripsiyonunu arttırmada gösterilebilir bir role sahiptir. İlginç bir şekilde, HIF-2α aynı zamanda eritropoetin transkripsiyonunun düzenlenmesinde

baskın faktördür ve hipoksiye yanıt sırasında demir temini ile eritropoez arasında bir koordinatör olarak olası rolü oynar [6]. Çalışmalar HIF-2α'nın demir eksikliği ve hipoksi durumlarında Dcytb ve DMT1 ve ferroportini etkileyerek serum demirini arttırdığını gösteriyor.

Bizim çalışmamızda demir eksikliği anemisi hastaları ve kontrol grubunun serum HIF-2α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0,199). Taylor ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada diyet demirindeki akut düşüşler, DMT-1 ve Dcytb yoluyla apikal demir taşınmasında adaptif bir artışı uyaran ve ferroportin aracılığıyla bazolateral demir transferindeki artış yoluyla demiri dolaşıma harekete geçiren bağırsak HIF-2α sinyalini aktive eder. Bununla birlikte, kronik düşük demir durumları sırasında ferroportin, HIF-2α sinyallemesinden bağımsız olarak etkinleştirilir. Ferroportin, mRNA indüksiyonundan bağımsız olarak yüksek oranda indüklenir [57]. Seçilen hasta grubunda demir eksikliği kronik bir süreç olduğu için HIF-2α seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamış olabilir. Ayrıca hastalarımızın ortalama Hb düzeyleri 9,7 g/dL olarak ölçüldü. Bu Hb seviyesi doku düzeyinde hipoksi yaratmayıp HIF-2α 'nın sentezinde artışa neden olmamış olabilir.

Ghrelin, gıdadan yoksun mide tarafından salgılanan, 28 amino asitli, büyüme hormonu salgılayan bir peptit hormonudur [39]. Ghrelinin serin-3'ü, GOAT (Ghrelin O-Asiltransferaz, politopik zara bağlı bir enzim) tarafından sekiz karbonlu bir yağ asidi (oktanoat) ile açillenir [40]. Açillenmiş ghrelin, ghrelinin aktif formudur. Bu hormon, beyinde gıda alımını, vücut ağırlığını, adipoziteyi ve glikoz metabolizmasını düzenlemek için hareket eder, oreksijenik nöral iletinin aktivasyonu yoluyla sistemik metabolizmayı düzenler ve merkezi ve periferik dokularda çok sayıda başka işlev görür [59].

Ghrelin iştahı artırır ve açlık sırasında gıda alımını uyarır [60]. İştahsızlık demir eksikliği anemisinin en belirgin klinik özelliklerinden biridir ve azalmış ghrelinden kaynaklanabilir [43]. DEA bir açlık halidir. DEA'nin üç farklı aşamasında (hipoferritinemi/DE/DEA) plazma ghrelin ve demir düzeylerindeki değişiklikler üzerine yapılan bir araştırma, hem ghrelin düzeyinin hem de demir içeriğinin plazmada azaldığını, DEA'lı çocuklarda en düşük seviyelere ulaştığını; plazmadaki bu iki parametre arasında önemli bir pozitif korelasyon olduğunu gösterdi [41]. İşgüven ve

arkadaşları DEA'lı prepubertal çocuklarda hem ghrelin hem de demir düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir [42]. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, sistemik demir homeostazının ana düzenleyicisi olan hepsidin ve serumdaki ghrelinin DEA'lı çocuklarda demir tedavisi ile tedavi öncesi seviyelere ve sağlıklı çocuklara kıyasla arttığını göstermiştir, demir tedavisinin serum hepsidin ve ayrıca ghrelin sentezinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir [43]. Düzce Üniversitesi'nde 87 hasta 50 kontrol grubu ile yapılan çalışmada demir eksikliği anemili hasta grubunda ghrelin düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır [54].Yapılan bu çalışmalarda ghrelinin demir eksikliği anemisi hastalarındaki seviyesi ve tedavi sonrası artışı açlık-tokluk, iştah mekanizmaları ile açıklanmaya çalışılmıştır [41-43, 54].

2020 yılında yapılan bir başka çalışmada DEA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla iştahta azalma ve paradoksal olarak yüksek ghrelin hormon aktivitesi tespit edilmiştir. DEA'yı tedavi etmek iştahı artırıp ve ghrelin düzeylerini düşürmüştür [44]. Önceki çalışmalarla farklı sonuçlar elde edilmiş olması hastaların yaş grupları, ghrelin yerine açillenmiş ghrelin kullanılması, DEA bir malnütrisyon durumu olarak kabul edilip açillenmiş ghrelini arttırdığı savunulmuştur. Literatürde DEA hastaların ghrelin seviyeleri arasında bir paradoks mevcuttur. Bizim çalışmamızda hasta grubunun medyan ghrelin düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü (2111,3 [IQR: 1848,26-3249,59] ve 4215,62 [IQR: 2493,06-5911,4]; $p<0,001$). Literatürdeki birçok çalışma ile uyumlu idi[41-43, 54].

Bununla birlikte hasta ve kontrol gruplarımız arasında hepsidin HIF-2α ve ghrelin arasında korelasyonlar tespit edildi. Demir eksikliği anemisi olan hastalarda hepsidin-HIF-2α ($r=0,728$; $p<0,001$) ve hepsidin-ghrelin düzeyleri ($r=0,869$; $p<0,001$) arasında ayrıca HIF-2α-ghrelin düzeyi ($r=0,771$; $p<0,001$) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Kontrol grubundaki kişilerin hepsidin-HIF-2α ($r=0,728$; $p<0,001$) ve hepsidin-ghrelin düzeyleri ($r=0,869$; $p<0,001$) arasında ayrıca HIF-2α ile ghrelin düzeyi ($r=0,771$; $p<0,001$) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Bu durum her üç molekülün demir eksikliği metabolizmasında rolü olduğunu ve birbirleri ile etkileşimde olduğunu düşündürttü.

Hepsidin ve ghrelin arasında hem hasta grubunda hem de kontrol grubu arasında pozitif korelasyon saptanması mevcut literatür bulguları ile uyumludur [43]. DEA'da hepsidin ve ghrelin düşük iken; kontrol grubunda hepsidin ve ghrelin daha yüksek seviyelerdedir. Bu moleküller arasında pozitif korelasyon bulunması da bu durumu destekler. Demir eksikliği anemisi olan hastalarda hepsidin ile ghrelin düzeyleri ($r=0,869$; $p<0,001$) pozitif yönde anlamlı ilişki mevcuttur. Kontrol grubundaki kişilerin hepsidin ile ghrelin düzeyleri ($r=0,869$; $p<0,001$) pozitif yönde anlamlı bir ilişki mevcuttur.

Çalışmamızda kontrol grubunda HIF-2α ile hepsidin ($r=0,728$; $p<0,001$) ve HIF-2α ile ghrelin düzeyi ($r=0,771$; $p<0,001$) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Hasta grubunda HIF-2α ile hepsidin ($r=0,728$; $p<0,001$) ve HIF-2α ile ghrelin düzeyi ($r=0,771$; $p<0,001$) arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Hasta grubunda hemoglobin ile HIF-2α düzeyi arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon olduğu belirlendi ($r=0,412$; $p=0,003$). Ayrıca hastaların ferritin değerleri ile HIF-2α düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyona rastlandı ($r=0,452$; $p=0,001$). Literatür bilgilerimize göre HIF-2α'nın demir eksikliği ve hipoksi durumunda arttığı yönünde bilgiler mevcuttur [6, 20, 21]. HIF-2α etkilerini ferroportin üzerinden gösterir [6]. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında HIF-2α seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmayıp; her iki grupta HIF-2α'nın hepsidin ve ghrelin arasında pozitif ilişkisinin olduğu görüldü. Hepsidin ve HIF-2α 'nın etkilerini ferroportin üzerinden gösterdiği bilinmekle birlikte moleküller arasında pozitif korelasyonların saptanması bu bağlantının ferroportin üzerinden şu anda bilinmeyen bir mekanizma ile etkili olduğunu düşündürdü. HIF-2α'nın demir eksikliği ve hipoksi dışında farklı faktörlerden de etkilenebileceği ve daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu kanısına varıldı.

Demir eksikliği anemisi hastalarında HIF-2α ve hepsidinin ferroportin düzeylerini etkileyerek demir emilimini düzenlediğine dair çalışmalar mevcuttur. Ayrıca literatürde ghrelin ve demir eksikliği anemisi ile ilgili yapılmış çalışmalar da vardır. Bu çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Ghrelin ve demir eksikliği arasında yapılan çalışmalar bu ilişkiyi açlık tokluk mekanizmaları ile açıklamıştır. Luo ve arkadaşları tarafından ghrelinin farelerin dalağında GHSR1α, GOAT, hepsidin, ferritin hafif zinciri ve ferroportin1 ekspresyonunu arttırdığını

göstermiştir [4]. Ghrelinin hepsidin ve ferroportin ekspresyonunu arttırdığını gösteren bu çalışma bize ghrelinin demir metabolizmasında rolü olduğunu düşündürdü. Böylece ferroportini etkileyen diğer moleküller ile arasında bağlantı olabileceği şeklinde bir öngörü oluşturdu. Biz bu çalışmamızda HIF-2α, hepsidin ve ghrelin düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek demir eksikliği anemisi hastalarında demir emilim metabolizmasına katkıda bulunmayı hedefledik.

5.1. ÇALIŞMA KISITLILIKLARI

Çalışmamız serum örneklerinden yapıldığı için hücresel düzeyde hepsidin, HIF-2α ve ghrelinin etkileşimini gösteremedik. Demir eksikliği anemisi hastalarında demir emilim metabolizmasının açıklanmasında bağırsak hücrelerinde yapılacak olan hücre kültür çalışmalarıyla hepsidin, HIF-2α ve ghrelin daha detaylı incelenebilir. Daha geniş gruplarda, hücresel düzeyde yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tedavi sonrası hepsidin, ghrelin, HIF-2α seviyelerinin değişimlerini gözlemleyemedik.

6. SONUÇLAR

Hasta grubuyla kontrol grubu kıyaslandığında hasta grubunun hem hemoglobin değeri hem de ferritin değeri kontrol grubunda göre anlamlı derecede düşüktü.

Hasta grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında, hasta grubunda serum hepsidin düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı. Anemi durumunda hepsidinin ferroportin üzerindeki baskısı azalarak demirin emilimi ve plazmaya verilmesine katkıda bulunduğu bilinir. Böylece dokuların ihtiyacı olan demirin temini sağlanmaya çalışır. Hasta grubumuzda da buna uygun olarak serum hepsidin seviyesi kontrol grubundan daha düşük bulundu.

Hasta grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında serum HIF-2α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Diyet demirindeki akut düşüşler, DMT-1 ve Dcytb yoluyla apikal demir taşınmasında adaptif bir artışı uyaran ve ferroportin aracılığıyla bazolateral demir transferindeki artış yoluyla demiri dolaşıma harekete geçiren bağırsak HIF-2α sinyalini aktive eder. Bununla birlikte, kronik düşük demir durumları sırasında ferroportin, HIF-2α sinyallemesinden bağımsız olarak etkinleştirilir. Ferroportin, mRNA indüksiyonundan bağımsız olarak yüksek oranda indüklenir. Seçilen hasta grubunda demir eksikliği kronik bir süreç olduğu için HIF-2α seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamış olabilir. Ayrıca hastalarımızın ortalama Hb düzeyleri 9,7 g/dL olarak ölçüldü. Bu Hb seviyesi doku düzeyinde hipoksi yaratmayıp HIF-2α ‘nın sentezinde artışa neden olmamış olabilir.

Hasta grubu ile kontrol grubu serum ghrelin düzeyleri kıyaslandığında hasta grubunun serum ghrelin düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Hastalardaki ghrelin düzeyindeki düşüklüğün demir metabolizması ile ghrelin arasında bir ilişki olduğunu düşündürttü.

Hasta ve kontrol grupları arasında hepsidin HIF-2α ve ghrelin arasında korelasyonlar tespit edildi. Demir eksikliği anemisi olan hastalarda hepsidin-HIF-2α ve hepsidin-ghrelin düzeyleri arasında ayrıca HIF-2α-ghrelin düzeyi arasında pozitif yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Kontrol grubundaki kişilerin hepsidin-HIF-2α ve hepsidin-ghrelin düzeyleri arasında ayrıca HIF-2α-ghrelin düzeyi arasında pozitif

yönde güçlü bir ilişkiye rastlandı. Bu durum her üç molekülün demir metabolizmasında rolü olduğunu ve birbirleri ile etkileşimde olduğunu düşündürdü.

Hasta grubunda hemoglobin ile HIF-2α düzeyi arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon olduğu belirlendi. Ayrıca hastaların ferritin değerleri ile HIF-2α düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyona rastlandı. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında HIF-2α seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmayıp; her iki grupta HIF-2α'nın hepsidin ve ghrelin arasında pozitif ilişkisinin olduğu görüldü. Hepsidin ve HIF-2α 'nın etkilerini ferroportin üzerinden gösterdiği bilinmekle birlikte moleküller arasında pozitif korelasyonların saptanması bu bağlantının ferroportin üzerinden şu anda bilinmeyen bir mekanizma ile etkili olduğunu düşündürdü. HIF-2α'nın demir eksikliği ve hipoksi dışında farklı faktörlerden de etkilenebileceği ve daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu düşündürdü.

Etkilerini ferroportin üzerinden gösteren hepsidin ve HIF-2α molekülleri ile ghrelin arasında saptanan korelasyonlar ghrelinin demir metabolizması arasındaki ilişkisinin açlık-tokluk ve beslenme mekanizmasından farklı olarak moleküler seviyede ilişkili olduğunu düşündürdü.

Ghrelinin farelerin dalağında GHSR1α, GOAT, hepsidin, ferritin hafif zinciri ve ferroportin1 ekspresyonunu arttırdığını gösteren bir çalışma mevcuttur. Ghrelin ve HIF-2α arasında saptanan korelasyonun ghrelinin HIF-2α üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde ileri araştırmalara ihtiyaç duyduğunu düşündürdü.

7. KAYNAKLAR

1. Kassebaum, N.J., et al., *A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010.* Blood, 2014. **123**(5): p. 615-24.
2. Alamri, B.N., et al., *The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis.* Horm Mol Biol Clin Investig, 2016. **26**(1): p. 3-11.
3. Perchard, R. and P.E. Clayton, *Ghrelin and Growth.* Endocr Dev, 2017. **32**: p. 74-86.
4. Luo, Q.Q., et al., *Fasting up-regulates ferroportin 1 expression via a Ghrelin/GHSR/MAPK signaling pathway.* J Cell Physiol, 2018. **233**(1): p. 30-37.
5. Wang, C.Y. and J.L. Babitt, *Hepcidin regulation in the anemia of inflammation.* Curr Opin Hematol, 2016. **23**(3): p. 189-97.
6. Drakesmith, H., E. Nemeth, and T. Ganz, *Ironing out Ferroportin.* Cell Metab, 2015. **22**(5): p. 777-87.
7. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism.* Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(10): p. 940-59.
8. Galaris, D. and K. Pantopoulos, *Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects.* Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. **45**(1): p. 1-23.
9. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism.* Biochem J, 2011. **434**(3): p. 365-81.
10. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a011668.
11. Finch, C.A. and H. Huebers, *Perspectives in iron metabolism.* N Engl J Med, 1982. **306**(25): p. 1520-8.
12. Korolnek, T. and I. Hamza, *Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells.* Blood, 2015. **125**(19): p. 2893-7.
13. Cook, J.D. and E.R. Monsen, *Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption.* Am J Clin Nutr, 1976. **29**(8): p. 859-67.
14. Hentze, M.W., et al., *Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism.* Cell, 2010. **142**(1): p. 24-38.

15. Breuer, W., et al., *The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation.* Blood, 2000. **95**(9): p. 2975-82.
16. Beguin, Y., et al., *Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin.* Blood, 1993. **81**(4): p. 1067-76.
17. Chen, W., H.A. Dailey, and B.H. Paw, *Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis.* Blood, 2010. **116**(4): p. 628-30.
18. Ponka, P., *Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells.* Blood, 1997. **89**(1): p. 1-25.
19. Anderson, S.A., et al., *The IRP1-HIF-2α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption.* Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 282-90.
20. Srai, S.K., et al., *Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure.* Kidney Int, 2010. **78**(7): p. 660-7.
21. Mastrogiannaki, M., P. Matak, and C. Peyssonnaux, *The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions.* Blood, 2013. **122**(6): p. 885-92.
22. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization.* Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
23. Finch, C., *Regulators of iron balance in humans.* Blood, 1994. **84**(6): p. 1697-702.
24. Kautz, L., et al., *Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1503-9.
25. Arndt, S., et al., *Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo.* Gastroenterology, 2010. **138**(1): p. 372-82.
26. Silvestri, L., et al., *The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin.* Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 502-11.

27. Du, X., et al., *The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency.* Science, 2008. **320**(5879): p. 1088-92.
28. Nicolas, G., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation.* J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 1037-44.
29. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein.* Blood, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
30. Tanno, T., et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin.* Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
31. Liu, J., et al., *Hepcidin: A Promising Therapeutic Target for Iron Disorders: A Systematic Review.* Medicine (Baltimore), 2016. **95**(14): p. e3150.
32. *Eritrosit Hastalıkları ve Hemoglobin Bozuklukları Klavuzu Bölüm III Yetişkinde Demir Eksikliği Tanı ve Tedavi Klavuzu. 2022; 22-34]. Available from: https://www.thd.org.tr/thdData/Books/1854/bolum-iii-yetiskinde-demir-eksikligi-tani-ve-tedavi-kilavuzu.pdf.*
33. Auerbach, M. and J.W. Adamson, *How we diagnose and treat iron deficiency anemia.* Am J Hematol, 2016. **91**(1): p. 31-8.
34. Guyatt, G.H., et al., *Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview.* J Gen Intern Med, 1992. **7**(2): p. 145-53.
35. Organization, W.H., *Iron deficiency anemia assessment,prevention and control : a guide for programme managers*. 2001.
36. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease.* N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 1011-23.
37. Locatelli, F., et al., *Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure.* Nephrol Dial Transplant, 2004. **19 Suppl 2**: p. ii1-47.
38. Thomas, D.W., et al., *Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency.* Br J Haematol, 2013. **161**(5): p. 639-48.
39. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.* Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
40. Yang, J., et al., *Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone.* Cell, 2008. **132**(3): p. 387-96.

41. Akarsu, S., et al., *Plasma ghrelin levels in various stages of development of iron deficiency anemia.* J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(6): p. 384-7.
42. Isguven, P., et al., *Serum levels of ghrelin, leptin, IGF-I, IGFBP-3, insulin, thyroid hormones and cortisol in prepubertal children with iron deficiency.* Endocr J, 2007. **54**(6): p. 985-90.
43. Dogan, A., et al., *Increased serum hepcidin and ghrelin levels in children treated for iron deficiency anemia.* J Clin Lab Anal, 2013. **27**(1): p. 81-5.
44. Ghrayeb, H., et al., *Appetite and ghrelin levels in iron deficiency anemia and the effect of parenteral iron therapy: A longitudinal study.* PLoS One, 2020. **15**(6): p. e0234209.
45. Organization, W.H., *Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers*. 2001, World Health Organization.
46. Kulaksiz, H., et al., *Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia.* Gut, 2004. **53**(5): p. 735-43.
47. Fleming, R.E. and B.R. Bacon, *Orchestration of iron homeostasis.* N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1741-4.
48. Ganz, T., *Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages.* Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(2): p. 171-82.
49. Ganz, T. and E. Nemeth, *Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(7): p. 690-9.
50. Dallalio, G., T. Fleury, and R.T. Means, *Serum hepcidin in clinical specimens.* Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 996-1000.
51. Kemna, E.H., et al., *Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples.* Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(3): p. 339-46.
52. Kaya, Z., et al., *Serum prohepcidin levels in children with solid tumors, inflammatory bowel disease and iron deficiency anemia.* J Trop Pediatr, 2011. **57**(2): p. 120-5.

53. Orhon, F.S., et al., *Serum pro-hepcidin levels in infants with iron deficiency anaemia.* Int J Lab Hematol, 2008. **30**(6): p. 546-7.
54. Kılıç, H.C., *Demir Eksikliği Anemisinde Tedavinin Gherelin ve Hepsidin Düzeylerine Etkisi*, in *Düzce Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği*. 2017, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi
55. Xu, M.M., J. Wang, and J.X. Xie, *Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors.* Sheng Li Xue Bao, 2017. **69**(5): p. 598-610.
56. Ban, H.S., Y. Uto, and H. Nakamura, *Hypoxia-inducible factor (HIF) inhibitors: a patent survey (2016-2020).* Expert Opin Ther Pat, 2021. **31**(5): p. 387-397.
57. Taylor, M., et al., *Hypoxia-inducible factor-2α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice.* Gastroenterology, 2011. **140**(7): p. 2044-55.
58. Shah, Y.M., et al., *Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency.* Cell Metab, 2009. **9**(2): p. 152-64.
59. Tschöp, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents.* Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
60. Wren, A.M., et al., *Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5992.