

T1668



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**DEMİR EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARIN
T LENFOSİTLERİNDEKİ TRANSFERRİN RESEPTÖR
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Hasibe ARTAÇ

Uzmanlık Tezi

T1668 / 1-1

**Tez Danışmanı:
Prof.Dr.Akif YEŞİLİPEK**

"Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 2002.103.03 Proje No ile desteklenmiştir."

"Tezinden kaynakça gösterilerek yararlanılabilir"

Antalya, 2004

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı,
başta tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Akif Yeşilipek olmak üzere,
Sayın Prof.Dr. Olcay Yeğın, Doç. Dr. İhsan Karadoğın,
Biolog Mesut Coşkun ve Biolog Feride Özel ile
uzmanlık eğitimim boyunca çalıştığımız tüm öğretim üyeleri ve
asistan arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1 - 3
2. GENEL BİLGİLER	4 - 25
2.1. Demir Eksikliği Anemisi	4
2.1.1. İnsidans ve prevalans	4
2.1.2. Demirin biyokimyası	5
2.1.3. Demirin vücuttaki dağılımı	6
2.1.4. Demirin emilimi	6
2.1.5. Demir emiliminin regülasyonu	7
2.1.6. Demirin interselüler transportu	8
2.1.7. Demirin intraselüler metabolizması	9
2.1.8. Proliferasyon ve diferansiyasyonda demirin rolü	10
2.1.9. Demir depolanması ve transportunun moleküler genetiği	11
2.1.10. Demir eksikliğinin etyolojisi	12
2.1.11. Demir eksikliğinin sonuçları	14
2.1.12. Tanı	18
2.1.13. Ayırıcı tanı	21
2.1.14. Tedavi	21
2.1.15. Proflaksi	22
2.2. Akış sitometresi	23

3. OLGULAR ve METODLAR	26 - 29
3.1. Olgular	26
3.2. Metodlar	27
3.2.1. Mononükleer hücrelerin ayırılması	27
3.2.2. PHA ile stimülasyon	27
3.2.3. Akış sitometrik analiz	28
3.2.4. Monoklonal antikolar	28
3.3. İstatistik	29
4. SONUÇLAR	30 - 34
5. TARTIŞMA	35 - 38
ÖZET	39 - 40
KAYNAKLAR	41 - 50

SİMGELER VE KISALTMALAR

DE	: Demir eksikliği
DEA	: Demir eksikliği anemisi
TS	: Transferrin saturasyonu
sTfR	: Serum veya solubl transferrin reseptörü
PHA	: Fitohemaglutinin
IRE	: Iron responsive element
IRP-1	: Iron regulatory protein
GİS	: Gastrointestinal sistem
GGK	: Gaitada gizli kan
CRP	: C-reaktif protein
PBS	: Phosphate buffered saline
FCS	: Fetal calf serum
SEP	: Serbest eritrosit protoporfirini
Min X	: Ortalama kanal numarası

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Demirin intestinal emilimi	8
Şekil 2.2. Transferrin reseptörünün yapısı	9

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 4.1. Grupların cinsiyet dağılımı	30
Tablo 4.2. Grupların yaş, boy ve kilo persentillerinin karşılaştırılması	30
Tablo 4.3. Grupların laboratuvar parametrelerinin karşılaştırılması	32
Tablo 4.4. Grupların CD3 ile CD3 ⁺ mononükleer hücrelerdeki CD71 giriş ve çıkış değerlerinin karşılaştırılması	34

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Demir tüm yaşayan hücreler için gerekli olan, DNA sentezinden hemoglobinin dokulara oksijen taşımaya kadar bir dizi yaşamsal fonksiyonda önemli rol oynayan esansiyel bir elementtir (1). Demir eksikliği anemisi (DEA) gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın nutrisyonel eksikliklerdendir (2). Demir eksikliği (DE)'nin majör sonuçları; büyüme gelişme, bilişsel ve immün fonksiyonlar ile çalışma performansında azalmayı içermektedir (3).

Anemi DE'nin geç bir bulgusudur. DE'nin erken evresinde hemoglobin ve MCV normal olabilir (4). Prelatent dönemde (depo demirinin azalması) ferritin azalmaya başlar. DE eritropoezi etkilediğinde (latent dönemde) transferrin reseptörü (TfR), demir, total demir bağlama kapasitesi ve serbest eritrosit protoporfirin (SEP) düzeyi değişir. Latent dönemde en erken sTfR düzeyi yükselir (2).

Literatürde DEA'de hücre immunitenin ve nötrofillerin öldürme fonksiyonunun azaldığı belirtilmektedir (5). Ancak demir eksikliğinde meydana gelen immün defektin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Anemi gelişmeden önce demir eksikliğinin immuniteyi etkilediğine dair birkaç yayın olmakla birlikte bu ilişki kesin değildir. Yayımlanan çalışmaların örnek büyüklükleri yetersiz ve çoğu deneysel çalışmalardır.

Transferrin reseptörü; disülfid bağı ile bağlanmış 2 monomerden oluşan bir transmembran proteindir (6). Asıl fonksiyonu transferrine bağlanmak ve endostoz ile hücre içine demiri almaktır. Bütün hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir. Büyük çoğunluğu eritroid öncül hücreler ve

plesental trofoblast hücreleri gibi hızlı bölünen hücrelerde bulunur (7,8,9). TfR ekspresyonu hücrenin büyüme hızına ve demir ihtiyacına bağlıdır. sTfR, membrana bağlı reseptörün ekstraselüler kısmının kopması ile oluşur. sTfR, total eritropoez ve demir eksikliği için en duyarlı göstergedir (10). Sirkülasyondaki TfR' nün %75'i eritrosit yüzeyinden gelir (11) ve demir eksikliğinin şiddeti ile orantılı olarak artar. Hızlı bölünen hücreler büyüme ve metabolizmaları için demire ihtiyaç duyarlar ve TfR ekspresyonunu artırırlar. Fitohemaglütinin (PHA) ile stimüle olmuş periferik kan lenfositlerinde mitozun S fazının başlamasından biraz önce TfR ekspresyonunda belirgin artış görülmüştür. TfR'nü bloke eden antikörlerin hücre büyümesi ve DNA sentezini inhibe ettiği tesbit edilmiştir (4-12). Bunlara bağlı olarak TfR ile satüre olan demir azaldığında lenfosit proliferasyonun azaldığı ve immun cevapta yetmezlik olduğu belirtilmektedir (13). Fakat DE'de ve DEA'de TfR ekspresyonunun nasıl etkilendiği bilinmemektedir. Bununla ilgili yayınlanan 3 çalışmanın ikisinde periferik lenfositlerdeki TfR ekspresyonunda azalma tesbit edilmiş, 30 günlük demir tedavisi ile TfR ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (14-15). Diğer bir çalışmada ise TfR ekspresyonunda değişme olmadığı belirtilmiştir (16). Bu çalışmalarda anemi gelişmeden önceki DE ve serum TfR düzeyi değerlendirilmemiş, periferik lenfositlerdeki TfR ekspresyonuna total olarak bakılmıştır. Birçok yayında DEA'de B lenfositlerin etkilenmediği belirtilmektedir (17). Bu nedenle TfR ekspresyonunun, T lenfositlerinde değerlendirilmesinin daha doğru olacağını düşünüyoruz.

Demir eksikliğinde anemi varlığında ve yokluğunda T lenfositlerdeki TfR ekspresyonundaki değişmeyi değerlendirmek, prelatent ve latent demir eksikliğinde T lenfosit proliferasyonunun etkilenip etkilenmediğini tesbit etmek için bu çalışma planlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı; demir eksikliği ile T lenfositlerdeki TfR ekspresyonunun ilişkisini araştırarak, demir eksikliğinde meydana gelen hücresel immün yetmezliğin mekanizmasının aydınlanmasına katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demir Eksikliği Anemisi

Demir; tüm yaşayan hücreler için gerekli olan, DNA sentezinden hemoglobinin dokulara oksijen taşımaya kadar pekçok yaşamsal fonksiyonda önemli rol oynayan esansiyel bir elementtir (1) DEA; total vücut demirinde ve hemoglobin üretiminde azalmayla sonuçlanan çocukluk çağında en sık görülen anemidir (2). Büyüme ve gelişmede gerilik, bilişsel ve immun fonksiyonlarda azalma, davranış değişiklikleri ve azalmış egzersiz intoleransı gibi birçok sistemi kötü yönde etkilemektedir (3).

2.1.1. İnsidans ve prevalans

DE, dünyadaki en yaygın nütrisyonel problemdir. DEA'nin dünyada yaklaşık 600 milyon insanı ve gelişmekte olan ülke çocuklarının 2/3'sini etkilediği belirtilmektedir (18). Demir depoları değerlendirildiğinde, latent ve prelatent DE prevalansının daha fazla olduğu görülmüştür (19). Özellikle 12-24 ay arasında düşük sosyoekonomik grupta ferritin düşüklüğü %62'ye kadar ulaşmaktadır (20). Süt çocuklarında DE her iki cinsiyette eşit sıklıkta artmıştır. Genellikle 6-20 ay arasında pik yapmakta ve prematürelde daha erken gelişmektedir (21). Ülkemizde yapılan prevalans çalışmaları şu şekilde özetlenebilir:

- Ankara'da Göktaş ve arkadaşları(22)'nin, 1997 yılında, 6 ay-2 yaş arasındaki 150 sağlıklı çocukta yaptığı çalışmada, anemi oranı %46, ferritin düşüklüğü %58 bulunmuştur.
- Okur ve arkadaşları(23)'nin yine Ankara'da, 1999 yılında yaptığı çalışmada, 6 ay-14 yaş arasındaki çocuklarda DE prevelansı % 58 ve DEA prevelansı %27 olarak bildirilmiştir.
- İstanbul'da Soylu ve arkadaşları(24)'nin 36 ay-5 yaş arasındaki 166 çocukta yaptığı çalışmada; DE prevelansı %72.3, DEA prevelansı %47.6 bulunmuştur.
- Şanlıurfa'da Koç ve arkadaşları(25)'nin 2000 yılında yaptığı çalışmada; 6-16 yaş arasındaki 2193 çocukta anemi etyolojisi ve sıklığı araştırılmış, anemi prevelansı 6-11 yaş arasında %1.5, 12-16 yaş arasında %5.4 bulunmuş, bunların % 58.9'da DEA tespit edilmiştir.

2.1.2. Demirin biyokimyası

Demir elektronlarını alma ve verme kapasitesine sahiptir. Bu ferrik ve ferroz form arasındaki dönüşümle olur. Bu özelliği sitokromlar, oksijen bağlayıcı moleküller (hemoglobin ve myoglobin) ve pekçok enzimin komponenti olmasını sağlar. Demir hemoglobinin yapısında oksijen taşıyıcısı olarak, sitokromlarda elektron alıcısı ve vericisi olarak ve deoksiribonükleotidlerin sentezinde anahtar enzim rolü oynayan ribonükleotid redüktazı da içeren çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak fonksiyon görür. Katalaz, akonitaz, ribonükleotid redüktaz, peroksidaz ve stokrom oksidazlar, yaşamsal kimyasal reaksiyonlara aracılık ederler (19).

2.1.3. Demirin vücuttaki dağılımı

Erişkin bir erkekte kilogram başına ortalama 35-45 mg demir vardır. Premenapozal kadınlarda mensturasyonla kan kayıpları nedeniyle demir depoları daha düşüktür. Denge durumunda, hergün 1-2 mg demir vücuda girer ve aynı oranda atılır. Vücuttaki demir içeriğinin 2/3'si hemoglobinin komponenti olarak eritroid öncül hücrelerde ve matür eritrositlerde bulunur. Yaklaşık % 10-15'i kas liflerinde (myoglobulin içinde) ve diğer dokularda (enzimlerde ve sitokromlarda) bulunur. Retikuloendotelial sistem makrofajları ve karaciğer parankim hücrelerinde depolanır (19).

2.1.4. Demirin emilimi

Dietle alınan demir miktarının düşük olmasına rağmen demirin intestinal absorpsiyonu çok hassas düzenlenir ve ekonomik bir şekilde kullanılır. Çünkü insanlarda demirin atılımı için fizyolojik yol yoktur.

Demir öncelikle duodenum ve proksimal jejunumdan emilir. Diyetteki demir hem demiri ve nonhem demiri olarak iki şekilde ince barsaklara ulaşır. Hem demiri absorbe edilmeye hazırdır ve emilimi gastrik PH'dan bağımsızdır. Askorbat ve sitrat demir emilimini artırır. Askorbik asit özellikle vejeteryan diyetteki nonhem demirinin emiliminde önemli rol oynar. Emilim için düşük PH gereklidir. Çünkü düşük PH, hem ferrik demirin ferröz demire dönüşümü, hem de demirle birlikte transport olan protonlar için gereklidir (26). Fizyolojik PH'da ferröz demir hızla insolubl ferrik demire dönüşür.

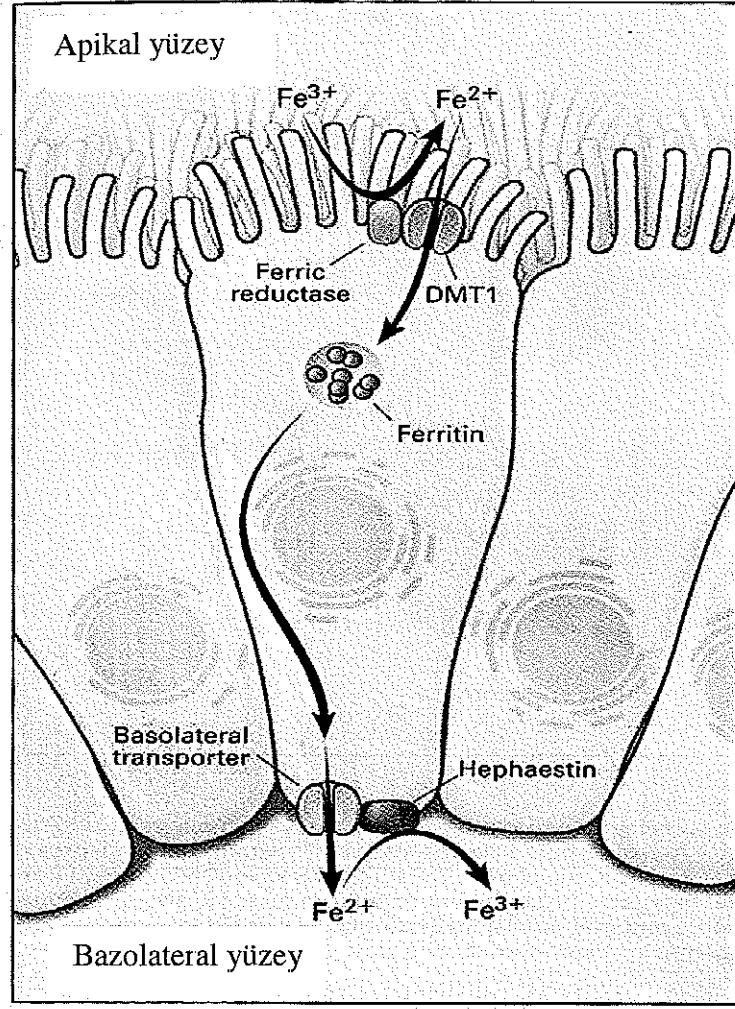
Barsak hücresinin apikal yüzeyinde bulunan ferrik redüktaz enzimi, ferrik demiri ferröz demire dönüştürür. Divalent metal transporter 1 (DMT1, DCT1 veya Nramp2) ferröz demirin apikal membrandan geçişini sağlar (27). Bu enzim iki değerlikli metallerin (mangan,

kobalt, çinko, bakır ve kurşun) transportunu da yapabilir (27). Demir absorpsiyonunun artmasıyla bu elementlerin absorpsiyonu da artmaktadır. DE'ne kurşun intoksikasyonunun eşlik etmesi bu mekanizma ile oluşmaktadır (28). Enterosite alınan demirin bir kısmı depolanır. Kalanı ise Ferroportin 1(Ireg1- bazolateral transporter) ile plazmaya verilir (29). Hephaestin, bazolateral yüzeyde ferröz demiri ferrik demire dönüştüren bir multibakır proteindir (30) (Bkz Şekil 2.1.).

2.1.5. Demir emiliminin regülasyonu

Absorpsiyon mekanizması ne olursa olsun duedonuma giren elemental demirin yalnızca %10'u absorbe edilmektedir. Demir emilimi çeşitli yollarla düzenlenir:

1. Besinsel düzenleme: Diyetteki demir miktarı arttıkça emilim artar. Fakat birkaç gün diette fazla demir alınırsa enterositlerde demire resistans gelişir ve buna mukozal blok denir. Bunun kesin mekanizması bilinmemekle birlikte enterositlerdeki hücre içi demir birikimine bağlanmaktadır (19,26).
2. Depo ile düzenleme: Total vücut demiri azaldıkça demir emilimi artar.
3. Eritropoez ile düzenleme: Eritropoez artarsa plazma demir dönüşümü artar ve demir emilimi de artar. Total vücut demir depolarından daha etkili olarak demir emilimini artırır. DEA'ne ek olarak çeşitli anemi durumları da (talasemiler, konjenital diseritropoetik anemiler ve sideroblastik anemiler gibi inefektif eritropoez durumları) diyetteki demir emiliminin artmasına yol açar. Akut hipoksiye cevap olarak da demir emilimini artar, fakat bunun mekanizması bilinmemektedir (19).

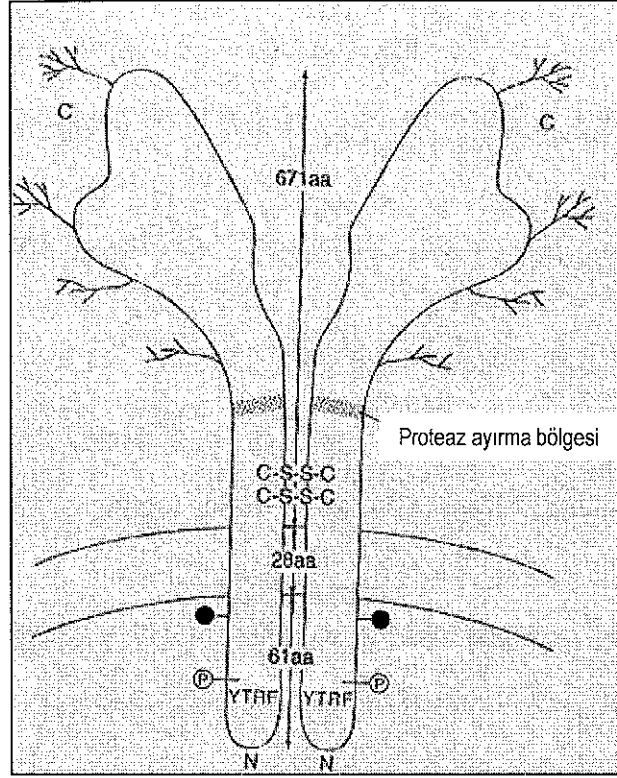


2.1.6. Demirin interselüler transportu

Total vücut demirinin %0.1'i transferrine bağlı olarak sirküle olur. Transferrine bağlanmanın 3 amacı vardır (31).

1. Demirin fizyolojik koşullarda solubl olarak plazmada taşınması
2. Demir aracılı toksisitenin önlenmesi
3. Hücreler arası transportun kolaylaştırılması

Normal kişilerde bütün dolaşan plazma demiri transferrine bağlıdır. Sirkülasyondaki transferrine bağlı olan demirin % 80'i kemik iliği ve yeni oluşan eritrositlere bırakılır. Demirin bırakıldığı diğer majör bölgeler; karaciğer ve dalaktır.



Şekil 2.2 : Transferrin reseptörünün yapısı

2.1.7. Demirin intraselüler metabolizması

Demirin hücre içine alınmasına hücre yüzeyindeki TfR aracılık eder. TfR disülfid bağı ile bağlanmış 2 monomerdan oluşan bir transmembran proteinidir (6) (Bkz Şekil 2.2). Asıl fonksiyonu transferrine bağlanmak ve endostoz ile demiri hücre içine almaktır. Demire ihtiyaç oranında eksprese edilir. Diferrik transferrin-TfR kompleksi oluşuktan sonra hücre zarının invaginasyonu ile endozom formunda hücre içine alınır. Demir sitozole verilir. Apotransferrin-TfR kompleksi ekstrasellüler yüzeye geri döner. Yüzeyde apotransferrin, diferrik transferrine dönüşerek tekrar sirkülasyona katılır. Eritrositlerde demir elde etmek için transferrine bağlı siklus önemlidir. Diğer dokular

alternatif mekanizmaları kullanabilirler. Eritroid olmayan dokular ihtiyaç duydukları demiri, hem demiri ve ferritinden karşılayabildikleri için transferrine daha az ihtiyaç duydukları düşünülmektedir (31). Eritrolösemik hücrelerde bir taşıyıcı proteinden bahsedilmiştir (32). Fitohemaglütinin ile stimüle edilmiş insan periferik lenfosit hücrelerinde de benzer transferrinden bağımsız demir transport mekanizması bulunmuştur (33).

2.1.8. Proliferasyon ve diferansiyasyonda demirin rolü

Demir yokluğunda proliferasyon durur. Çünkü ribonükleotid redüktaz ve diğer enzimler için demir gereklidir. Demir hemoglobinin yapısında oksijen taşıyıcısı olarak, sitokromlarda elektron alıcısı ve vericisi olarak ve deoksiribonükleotidlerin sentezinde anahtar enzim rolü oynayan ribonükleotid redüktazı da içeren çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak fonksiyon görür. Transferrin reseptörleri bütün bölünen hücrelerde eksprese edilir ve sayısı hücrenin büyüme hızını gösterir. T lenfositlerde TfR ekspresyonu ve hücre proliferasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Fitohemaglütinin ile stimüle edilmiş hücrelerde demir alımı ile birlikte TfR ekspresyonunun arttığı görülmüştür (34). Tümör hücrelerinde de TfR ekspresyonu up regüle olmaktadır. TfR'nin monoklonal antikolarla blokajı *invivo* ve *invitro* tümör hücre proliferasyonunu engellemektedir (35). İlginç olarak bu antikoların T hücre aktivasyonu ve IL-2 sekresyonunu tetiklediğini gösteren çalışmalar vardır (36). Desferrioksamin gibi demir şelatörleri ile yapılan çalışmalarda tümör hücre kültürlerinde büyümenin inhibe olduğu ve T hücre proliferasyonunun büyük ölçüde azaldığı tesbit edilmiştir. Bu inhibitör mekanizma azalmış ribonükleotid redüktaz aktivitesi ve düşük deoksiribonükleotid seviyelerine bağlıdır. Mitozun S fazında durmasına

yol açmaktadır (37). TfR'nün yoğunluğu eritrosit maturasyonu sırasında değişir. Demir gereksinimi ve TfR sayısı arasında korelasyon vardır.

2.1.9. Demir depolanması ve transportunun moleküler genetiği

Intraselüler demir konsantrasyonu; ferritin sentezini, TfR'nü ve ALAS (eritroid 5 aminolevulinate synthase) sentezini regüle eder. Çeşitli hücre tiplerinde, hücrenin proliferasyon hızı ve spesifik fonksiyonuna bağlı olarak demir metabolizması büyük değişiklikler gösterebilir. TfR ve ferritin sentez ve yıkımları , mRNA' larında bulunan IRE (iron responsive element) ve spesifik bir protein olan IPR-1 (iron regulatory protein) tarafından, demirin sitozoldeki yoğunluğuna göre ayarlanır. IPR-1 demir homeostazında anahtar rol oynayan stoplazmik bir proteindir. Yüksek bir afinite ile spesifik mRNA elementine (IRE) bağlanmaktadır. Eğer hücre içinde demir konsantrasyonu yüksekse IRP, IRE'ye bağlanamaz ve ferritin translasyonu gerçekleşir. Ancak TfR sentezi azalacağından demir alımı da azalır. Hücre sel demir azaldığında ise demir ile doymamış olan IPR-1 aktivitesi artar ve TfR mRNA' sının IRE bölgesine bağlanıp TfR yıkımını önleyerek sentezini arttırır. Ferritin mRNA' sına da bağlanarak onun sentezini inhibe eder. IRP'nin IRE'ye bağlanması pekçok hücre sel sinyalle düzenlenir. Hücre sel demir düzeyi dışındaki düzenleyiciler; nitrik oksit ve oksidatif streslerdir (H₂O₂ gibi). Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız olarak IRE'ye bağlanmayı aktive ederler. Böylece IRE/IRP sistemi demir alımı ve depolanması, eritroid hem sentezi ve Krebs siklusunu düzenler (38).

2.1.10. Demir eksikliğinin etyolojisi

A. Yetersiz demir alımı

Çocukluk süresince vücut kitlesi ile orantılı olarak gereksinim artar. Demir dünyanın ikinci bol elementi olmasına rağmen çözünürlüğünün düşük olması, metabolik kullanım için elde edilmesini zorlaştırır. Çevresel demirin çoğu insolubl tuzlar halinde bulunur. Diet faktörlerinin çoğu demir emilimini etkiler. Bitkilerin çoğu demir içerir. Fakat sıklıkla hem düşük solubilité hemde güçlü şelatörler nedeniyle absorpsiyonu sınırlıdır. Buđday ürünlerinde bulunan organik polifosfatlar çok büyük avidite ile demire bağlanır. Dietteki iki önemli nokta et, kümes hayvanları ve balık miktarı ile askorbik asit miktarıdır. Hem demiri absorbe edilmeye hazırdır ve uptake gastrik PH'dan bağımsızdır. Dünyadaki insanların çoğunda dietteki kırmızı etten fakir diet sonucunda demir eksikliği gelişir. Örneğin pirinç çoğu kişide bu problemi arttırır, çünkü bu bitkiler demirden fakirdir. Sonuç olarak besinsel demir kaynağı olarak en iyisi kırmızı ettir.

Düşük gastrik PH inorganik demirin absorpsiyonunu azaltır. Vagatomi, hemigastrektomi, sekonder demir eksikliği nedenidir. Bugün H₂ reseptör blokerlerinin kullanımı, proton pompa inhibitörleri, defektif demir absorpsiyonuna neden olur.

B. İhtiyacın artması

Büyümenin hızlı olduğu çocukluk çağında, düşük doğum ağırlığı, adölesan, gebelik ile siyanotik konjenital kalp hastalıklarında artan demir ihtiyacı karşılanamazsa DEA ortaya çıkar.

C. Emilimin azalması

a) Enterik mukozanın bozulması: İnflamatuvar barsak hastalıkları, çöliak hastalığı vb.

b) Demir absorpsiyonunun inhibisyonu: Kurşun, kobalt demir emilimi engelleyebilir.

c) Fonksiyonel barsak kaybı: Cerrahi prosedürden yıllar sonra yavaşça gelişebilir.

D. Kan kaybı

a) GİS, hem demirin emildiği hemde en yaygın kaybedildiği yerdir. GİS rakipsiz bir potansiyel gizli kan kaybı yeridir.

- DEA'nde barsak mukozasındaki demir içeren enzim eksikliğine bağlı mukozal kan kaybı gelişir.

- Anatomik barsak lezyonları: En sik konjenital defekt mekkel divertikülüdür. Diğerleri: Varisler, hiatus hernisi, kanserler, barsak duplikasyonu, herediter telenjiektazi, polipler, intestinal lenfanjiektazi vb dir.

- Çeşitli çalışmalarda H pylori enfeksiyonu olanlarda DEA prevalansı daha yüksek bulunmuştur. DEA'de relatif risk H pylori olanlarda %2.9 olarak belirtilmiştir (39). Şiddetli DEA olan 6 kişide endoskopi ile H pylori tesbit edilmiş ve sebebi bulunamayan DEA'de H pylorinin araştırılması gerektiği belirtilmiştir (40).

- İntestinal parazitler

- Henoç Schönlein purpurası

- İnek sütü ile ilişkili enteropati: Tam inek sütü infantlarda GİS mukozasında sıklıkla iritasyona neden olan proteinleri içerir. Eksudatif enteropati ile ilişkili kronik gastrointestinal kan kaybı demir eksikliğine neden olur. Özellikle demir tedavisine yetersiz hematolojik cevap, tekrarlayan DEA; barsaktaki diğer organik lezyonların yokluğunda GGK'nın pozitif olması; yetersiz demir alımı, hızlı büyüme ve düşük doğum ağırlığı ile açıklanamayan DEA; DE'ne eşlik eden hipoteinemi ve hipokupreminin (azalmış serum bakır seviyesi)

olması inek sütü ile ilişkili DEA'ni düşündürür. Ayrıca inek sütündeki demirin biyoyararlanımı daha düşüktür.

b) Üriner

c) Akciğer: Pulmoner hemosiderozis, Goodpasture sendromu

d) Uterus

e) Böbrek: Travmatik hemolitik anemi, hematüri, nefrotik sendrom (idrarla transferrin kaybı) vb.

f) Ekstrakorporal: Hemodializ, travma

g) Tekrarlayan burun kanamaları

2.1.11. Demir eksikliğinin sonuçları

Anemi: Demirin en çok kullanıldığı yer hemoglobin sentezi olup, DE'nin en önemli sonuçlarından biri anemidir. Demir eksikliğinin gelişiminde üç evre tanımlanmıştır.

A. Prelatent demir eksikliği: Serum demir seviyesinde azalma olmaksızın depo demirinin azalmasıdır. Ancak biopsi veya serum ferritin seviyesi değerlendirilerek tanı konulabilir.

B. Latent demir eksikliği: Depo demiri tamamen tükenmiştir. Hemoglobin seviyesinde değişiklik olmaksızın serum demiri ve TS (transferrin saturasyonu)'nunda düşüş, SEP'de artış vardır. Bu evrede ilk değişen laboratuvar testi sTfR düzeyi ve TfR/ Ferritin indexidir.

C. Aşırı demir eksikliği anemisi: Hemoglobin seviyesinin düşmesi, hipokrom mikrostik aneminin görülmesidir. Bu evrede doku oksijenlenmesi azalır, halsizlik, yorgunluk, çarpıntı oluşur. β Talasemi taşıyıcılığı ile karışır. MCV azalır, eritrosit dağılım hacmi artar. Eritrositlerin membranları rijittir. Bu katı, küçük, biçimsiz-deforme olmuş hücreler RES tarafından temizlenir. Sıklıkla demir eksikliğine

düşük düzeyde hemolizde eşlik eder. Açıklanamayan bir trombositoz vardır. Eritropoetin yüksek seviyeleri ile megakaryosit trombopoetin reseptörlerinin cross tepkisi sonucu olabileceği düşünülmektedir. İki çalışma ile platelet agregasyonunda defekt tesbit edilmiştir (41,42). DEA olanlarda Glutasyon peroksidaz aktivitesinde azalma bulunduğu bildirilmiştir (43).

Büyüme ve gelişme geriliği: DEA olsun olmasın büyüme ve bilişsel gelişmede gerilik vardır. Oski(44)'nin yaptığı çalışmada Bayley skalası kullanılarak süt çocuğu gelişimi değerlendirilen 9-12 aylarındaki çocuklarda, anemi olsun olmasın psikomotor gelişimde anormallik tesbit edilmiştir. Demir replasmanı ile yalnızca 7 günde mental gelişme skalasının düzeldiği görülmüştür. Lozoff(45)'un çalışmasında ise DEA olan (Hemoglobin 10'nun altında) bir grup süt çocuğu tedavi edilmiş ve 5 yaşına kadar izlenmiştir. Mental ve motor fonksiyonların süt çocukluğu dönemindeki demir eksikliği ile orantılı olduğu tesbit edilmiştir. Araştırmacılar DE olan infantların, demir durumu daha iyi olan yaşlılarına göre uzun süreli olarak gelişimsel dezavantajları olduğunu belirtmektedir (46,47). Bu çalışmalardan hareketle son yapılan bir çalışmada 1. Grup inek sütü, 2. Grup formula, 3. grup demirle güçlendirilmiş formula ile beslenen 493 çocuk çalışmaya alınmış ve 9 aydan 18. Aya kadar izlenen bebeklerin 18. aydaki Bayley gelişme skalası, antropometri ve serum TfR düzeyi arasında fark bulunmamıştır (48).

Nöral dokunun normal fonksiyonu için demir gereklidir. Ratlar, demiri eksik dietle beslendiğinde çeşitli davranış anormallikleri, motor inkoordinasyon ve konvülsiyonlar gözlenmiştir. Bu anormallikler yetişkin ve çocukta daha az belirgindir, fakat herşeye rağmen ciddi olayların kaynağı olabilir (49).

Lozoff ve arkadaşları(50)'nin yaptığı bir başka çalışmada DE'nin uzun süreli etkilerini belirlemek için kronik ve şiddetli demir eksikliği olan süt çocuklarının 11-14 yaşlarında bilişsel, sosyoemosyonel, motor testler ve sosyal fonksiyonlar ölçülmüştür. Süt çocukluğu döneminde DEA'si olanlarda aritmetik, yazma, motor fonksiyonlar ve bazı kognitif fonksiyonlarda azalma tesbit edilmiştir. Aileler ve öğretmenlerden alınan bilgilere göre çocukların anksiyete, depresyon ve sosyal problemlerin daha fazla olduğu görülmüştür.

Epitelyal değişiklikler: GİS epitelinin hızlı proliferasyon kapasitesi nedeniyle önemli GİS anormalliklerine neden olabilir.

Sızıntılı barsak sendromu: İzole gaitada gizli kan (GGK) pozitifliği veya eksudatif enteropati tablosuyla GİS'den protein, albumin, immunoglobulin, bakır, kalsiyum ve eritrosit kaybı şeklinde seyredabilen bir tablodur.

Angular stomatit, glossit, dil papillasında atrofi, tırnak anormallikleri, özofageal webler (Plummer- Vinson sendromu), gastrit ve aklorhidri diğer sonuçlarıdır.

İmmun sistemdeki değişiklikler: DE ve enfeksiyon arasındaki ilişki ile ilgili elde edilen veriler tartışmalıdır. DE'nin enfeksiyona eğilimi arttırdığı ileri sürülmekle birlikte, delillerin hiçbiri ikna edici değildir. Bu çalışmaların bazılarında, fakirliğin veya beslenme anormalliklerinin etkilerinden, DE'nin sonuçlarını ayırt etmenin zor olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalarda; demir destekli formula ile beslenen süt çocuklarında solunum ve GİS enfeksiyonlarının daha az olduğu gösterilmiştir (51,52). Bununla birlikte bu çalışmaların dizaynında eksiklikler vardır. Yani kesin klinik bilgi eksiktir. DE'nin enfeksiyonun süre ve sıklığını ne derecede etkilediği kesin olarak bilinmemektedir

(53). DE'nin sonucu olarak immun cevapta en az iki anormallik tanımlanmıştır (5):

- Hücresel immunitede defekt: Dolaşımdaki T lenfosit sayısında %35 oranında azalma gösterilmiştir. Hem supresör hem yardımcı T lenfositlerinin sayısında azalma tesbit edilmiştir (54). Ek olarak DE'de bazı deri testlerine (Candida, difteri ve trikofiton) cevabın olmadığı görülmüştür. Bu anormallikler demirin dağılımı ile korole olabilir. Ribonükleotid redüktaz demir içeren, DNA sentezi için gerekli bir enzimdir. Bu enzim aktivitesindeki azalmaya bağlı T lenfosit proliferasyonunun azalabileceği ve sonuç olarak hücresel immunitenin etkilendiği belirtilmektedir. Ek olarak lenfokinlerin (IL-1ve IL2) üretiminde azalma bildirilmiştir (55,56). Yapılan çeşitli çalışmalarda T lenfosit proliferasyonunda azalma tesbit edilmiştir. Hücresel immun cevapta azalmanın bir bölümünün T lenfosit proliferasyonunda azalma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (57). Deneysel bir çalışmada lenfosit proliferasyonunda rol oynayan protein kinaz C aktivitesinde azalma görülmüş ve bunun lenfosit proliferasyonun ve diğer fonksiyonların azalmasında rol oynayabileceği belirtilmiştir (58).

- Fagositozla bakteriyel öldürme fonksiyonunda azalma: DE'de NBT ile anormal sonuçlar alınmış ve demir takviyesi ile bu anormallik düzeltilebilmiştir (59,60). Ayrıca fagositoza eşlik eden oksidatif patlama ile bakteriyel öldürme mekanizmasında azalma gözlenmiştir (61). Sonuç olarak nötrofillerin çeşitli bakterileri öldürmesinde eksiklik bildirilmiştir (5,60). DE geliştirilen ratlarda nötrofil fonksiyonlarındaki değişiklikler incelenmiş ve myeloperoksidaz aktivitesinde azalma tesbit edilmiştir (62).

Antikor yanıtı değerlendirildiğinde Ig G cevabında değişiklik olmaksızın IgM cevabında azalma olduğu belirtilmektedir (63).

Diğer Sonuçları: Pika: Hem DE'e neden olur hem de DE'nin sonucunda oluşur. Patofizyolojisi bilinmemektedir.

DE'de GIS den ağır metalleri emilimi artar.

Splenomegali: Hastaların %10'nunda değişik derecelerde büyüme tanımlanmıştır. Organda spesifik patolojik değişiklik oluşmaz.

Menstrasyon bozuklukları

Katılma nöbeti: DE'nin katılma nöbetine neden olma mekanizması bilinmemektedir. Fakat demirin katekolamin metabolizmasındaki ve SSS'de nörotransmitterler ve enzim fonksiyonlarındaki etkisinin rol oynayabileceği belirtilmektedir (64,65).

DEA de kardiyak fonksiyonlarda demir tedavisi ile normale dönen bozulma tesbit edilmiştir (66).

2.1.12. Tanı

Hemoglobin: DEA'de yaş için kabul edilen sınırın altındadır.

Kırmızı küre indexleri:

MCV, MCH ve MCHC yaş için normal değerlerin altındadır. Anizositozu gösteren RDW (eritrosit dağılımının genişliği) artmıştır. Yüksek RDW, düşük MCV ile birlikte DE'ni en iyi değerlendirme testidir.

Periferik yayma: Eritrositler hipokrom ve mikrositerdir. Genellikle Hb 10 gr/dl'nin altına düşünce ortaya çıkar.

Retikülosit sayısı:

Genellikle normaldir. Fakat kanama ile ilişkili şiddetli DEA'de % 3-4 olabilir.

Platelet sayısı: Trombositopeniden trombositoza kadar değişiklik gösterir. Trombositopeni şiddetli DEA'de daha yaygındır.

Serbest eritrosit protoporfirini: Hem sentezindeki demirle birleşmeden önceki ara üründür. Demir depoları tükendiğinde kullanılmamış protoporfirin normoblastlarda birikir ve eritrositlerin dolaşıma verilmesi ile SEP artar. DE ve kurşun intoksikasyonunda artar, kurşun intoksikasyonunda daha yüksektir. DE'nin teşhisinde TS'na göre avantajları vardır. Düzeyi günlük dalgalanmalar göstermez. Demir depoları tükeninceye kadar, mikrositik anemi gelişmeden önce SEP artar. Ayrıca mikrositoz ve anemi henüz gelişmeden demir tedavisine cevabı göstermekte kullanılabilir. TS'nun aksine alfa ,beta talasemi minörde normaldir.

Serum demir ve TS: Yaş sex, lab metoduna göre normal varyasyonların fazlalığı, diurnal varyasyon, demir emiliminden etkilenmesi, hafif ve geçici enfeksiyonlarda düşmesi nedeniyle rutin teşhisinde kullanılması önerilmemektedir.

Ferritin: Serum ferritin seviyesi demir eksikliği ve demir artışında total vücut demir depolarını gösterir. Karaciğer hastalığı, enfeksiyon ve kronik enflamasyon varlığından etkilenir.

Serum TfR düzeyi: Solubl TfR'ü; membrana bağlı transferrin reseptörünün ekstrasellüler kısmının kopması ile oluşan, dolaşımdaki proteolitik üründür. Hücre yüzeyinde bulunan total reseptör konsantrasyonu ile plazma TfR düzeyi orantılıdır (67). Hücrenin demir ihtiyacı oranında eksprese edilen TfR miktarı ve dolayısıyla sTfR düzeyi artar. Ekspresyonu hücrenin büyüme hızı ve proliferasyon potansiyeline bağlıdır (7,8). Sirkülasyondaki TfR'nün %75'i eritrosit yüzeyinden gelir (68). En fazla demiri kullanan eritroid hücreler olduğu için, eritroid hücre kitlesi arttıkça (eritropoez) sTfR düzeyi de artar. Eritropoezin arttığı her türlü durumda (DE, hemoliz, kronik kan kaybı) sTfR düzeyi artar.

Demir eksikliğinde Hb ve diğer laboratuvar parametreleri ile korole sensitif bir ölçümdür. Latent DE'de (DE eritropoezi etkilemeye başladığında) ilk yükselen laboratuvar parametresi sTfR düzeyidir. DEA'nin değerlendirilmesinde ferritinden daha hassastır. Ferritin gibi akut faz reaktanı olmaması nedeniyle total eritropoez ve DE için en duyarlı göstergedir (10). DEA'nin diğer kronik hastalık anemilerinden ayrılmasında büyük değeri vardır, inflamasyonlarda artmaz. DE'nin şiddeti ile orantılı artmaktadır. Özellikle hafif DE'nin başlangıcında güvenilir ve sensitif bir ölçüm olarak belirtilmektedir (69).

Serum TfR-Ferritin indexi: Subklinik DE'nin değerlendirilmesinde depo demirini gösteren ferritin ile fonksiyonel demir kompartımanını gösteren sTfR düzeyi kombine edilmiştir. Ortaya çıkan sTfR/ferritin veya sTfR/log ferritin (TfR-ferritin indexi); Özellikle DEA'nin ayırıcı tanısında kullanılmıştır ve yapılan değerlendirmede subklinik DE'nin teşhisinde daha hassas olduğu belirtilmiştir (2).

Demir tedavisine cevap: DEA'de en güvenilir gösterge oral demir tedavisine yeterli hemoglobin cevabıdır. Retikülosit 5 ile 10 günler arasında hemoglobin artışına paralel olarak artar. Bu değişikliklerin yokluğunda aneminin sebebi DE değildir. Demir tedavisi kesilip tekrar değerlendirilmelidir. DEA teşhisi için gold standart olmamasına rağmen en iyi test demir tedavisine cevaptır (70).

Kemik iliği: Değişik derecelerde eritroid hiperplazi ile karakterizedir. Kemik iliği demir boyanması ile depo demirinin azaldığının veya yokluğunun gösterilmesi kesin tanı koydurucudur.

2.1.13. Ayırıcı tanı

Diğer hipokrom mikroster anemi sebeplerinden (hemoglobinopatiler, kurşun intoksikasyonu, kronik enfeksiyonlar veya inflamasyonlar vb) ayırıcı tanısı yapılmalıdır.

2.1.14. Tedavi

DE'nin tedavisinde ve değerlendirilmesinde en önemli basamak sebebinin bulunması ve anormalliğin düzeltilmesidir.

1. Oral tedavi: DE'nin tedavisinde ferröz(Fe^{2+}) demir etkilidir. 1999'da yayınlanan Andrews(19)'in makalesinde son yüzelli yıldır oral ferroz sülfat, primer terapötik ve koruyucu demir kaynağı olarak belirtilmiştir. Standart tedavi; 1,5-2 mg/kg/doz 3 dozda verilmesidir. İki ayda tedavi edilir, depoları doldurmak için 1 ay daha devam edilir. Oral demir tedavisinin başarısında en az 4 önemli değişken söz konusudur.

1. Günlük verilen doz
2. Veriliş sıklığı
3. Verilen form
4. Hastanın tedaviye uyumu

Demir preparatlarının GİS yan etkileri (diyare, konstipasyon, huzursuzluk, dişlerde lekelenme) vardır. Askorbik asit takviyesi demir absorpsiyonunu artırır. Oral demir tedavisine cevapsızlık durumunda gözden geçirilmesi gereken durumlar şunlardır:

- 1) Yanlış teşhis
- 2) İlave hastalık
- 3) Reçetenin uygulanmasında yanlışlık
- 4) Reçetenin doz veya form olarak yanlış olması
- 5) Alımdan fazla demir kaybı

6) Demir malabsorbsiyonu

2. Parenteral tedavi: Demir dextran kullanılır. Oral demirin tolere edilemediği, demir stoklarının hızlı replasmanının gerektiği veya GİS absorpsiyonunun sorunlu olduğu durumlarda endikedir. Difenhidramin, simetidin ve dexamethazon ile yapılan premedikasyondan sonra normal renal fonksiyonlu hastalarda etkili ve güvenli bir şekilde kullanılabilceği belirtilmiştir (71).

2.1.15. Proflaksi

Anne sütü alımının arttırılması, bir yaşından önce inek sütünün kullanılmaması, demir destekli formulalar, tahılların demirle güçlendirilmesi, demir katkılı tuz üretimi ve beraberinde askorbit asit alımının artışı ile gelişmiş ülkelerde DEA insidansı azalmıştır. Amerikan Pediatri Akademisinin önerileri (72):

1. Mümkünse en az 5-6 ay anne sütü ile beslenme sağlanmalıdır. Anne sütü ile beslenen infantlarda 6 aydan sonra 1mg/kg demir takviyesi sağlanmalıdır. Çünkü anne sütünün demir içeriği azdır.

2. Anne sütü almayan infantlar 6 aydan sonra yaşamının ilk yılında demir destekli formulalarla beslenmelidir.

3. Demirle güçlendirilmiş tahıllar, katı gıdalara ilk geçişte verilmelidir.

4. Gizli GİS kanamasını önlemek için yaşamın ilk yılında inek sütünden kaçınılmalıdır.

5. Prematüre infantlar hemen demir suplementasyonuna alınmalıdır.

Amerikan pediatri akademisi 9-12 aylardaki çocuklar yanında, risk altındaki 1-5 yaş çocukların da anemi için taranmasını tavsiye etmektedir. Infantlara yönelik uygulamalar, demir destekli formülalar,

demirle güçlendirilmiş yiyecekler ve özellikle yaşamın erken döneminde dietteki demir içeriğinin öneminin daha çok farkına varılması ile yaşamın ilk yılında anemi insidansı azalmıştır. Bununla birlikte 1-2 yaşlarında hala önemi devam etmektedir. Yetersiz demir alımı ile birkaç hafta veya ayda DEA kademeli olarak gelişebilir. DE'nin uzun süreli psikomotor, davranışsal ve gelişimsel etkileri bilinmektedir. Anemisiz DE'nin rolünü gösteren çalışmalar yetersizdir. Bu çocukların sınıflandırılmasında sensitif, spesifik ve ucuz araçlar geliştirilmeli ve değerlendirilmelidir. Bu metodlar bulununcaya kadar yaşamın ilk 2 yılında ulusal izleme programının devam etmesi vurgulanmıştır (73). AAP'nin tavsiyelerine göre 6-12 ay ve 15 ay-4 yaş arasında Hb'nin değerlendirilmesi önerilmiştir (74).

2.2. Akış Sitometresi

Temel olarak hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre seviyesinde araştırma sağlayan bir sistemdir. Süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B hücreleri ile T hücre alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tiplmesi, DNA analizi, fagositoz, antikor tayini ve kromozom analizi gibi birçok konuda kullanılmaktadır (75).

Sistemin çalışma prensibi, hücrelerin analizi ve aletin ayarlanma aşamalarına dayanır. Hücre analizi için vücut sıvıları ve parafin gömülmüş dokular kullanılır. Aletin kalibrasyonu ise polistren kaplı beadler kullanılarak yapılır (76). Hücre analizinde hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi ana kuraldır. Hücrelerin izolasyonundan ve saf eldesinden sonra bir veya daha fazla floresana bağlı monoklonal antikor veya diğer kromoforlar hücre ile konjuge edilir. Bu floresan bağlı monoklonal

antikorlara veya kromoforlara prob denir. Proplar hücre yüzey antijenine veya hücre içi elemanlarına spesifiktirler. İki farklı immünfloresan işaretleme tekniği kullanılır. Bunlar direk ve indirekt metodlardır.

1. Direk metotta antikorla konjuge olmuş florokrom madde kullanılır. Bu florokrom maddeler fluorescein isothiocyanate (FITC), Rhodamin ve phycoerythrin(PE) vb'dir. Bu sistemin avantajı; kullanılan antikorun monospesifik olması nedeniyle, nonspesifik bağlanmanın ihmal edilecek kadar az olmasıdır.

2. İndirek metotta süspansiyon halindeki hücelere ilk olarak işaretli monoklonal antikorlar bağlanır. İşaretsiz monoklonal antikorla birleşmiş bu hücrelerin analizi için ikinci bir işaretli monoklonal antikorun bu birinci antikora bağlanması gerekir. Bu sistemin avantajı çok düşük dansiteye sahip yüzey antijenlerinin gösterilebilmesi, dezavantajı ise, nonspesifik bağlanmaların direk metoda göre daha sık görülmesidir (76).

Akış sitometresi birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (Sheath Fluid), ışık kaynağı (lazer kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik sinyal ve elektrik sinyali), bilgisayar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizması (cell sorting) dır. Süspansiyon halindeki hücreleri alete vermeden önce lazer, bilgisayar ve elektronik sistemler devreye sokulur. Polystren kaplı partiküllerle lazer ayarı yapılır. Bu aletin kalibrasyonunu sağlar. Standart ve kontrollerin verilmesi ile de örneğin kalibrasyonu yapılır. Daha sonra çalışılacak popülasyon monitörde işaretlenir, histogram ayarı yapılır ve örnek alete verilir. Süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller hava basıncı ile Sheath fluid içinden geçirilir. Sheath fluid içinden Flow Chamber'a (akış kabini) gelirler. Bu kabinde hücreler tek sıra halinde dizilir ve lazer ışığının içinden geçerek

görünür hale gelir. İşaretlemede kullanılan problemler lazer ışığı ile aktive olduklarından ışın yayarlar ve bu sayede dedekte edilebilirler. Akış sitometresinde 4 fotodedektör vardır. Forward Angle Light Scatter (FALS), Right Angle Light Scatter (RALS), yeşil floresan ve kırmızı floresan (77). FALS önden saçılımı sağlar ve hücre boyutunu gösterir. RALS ise yandan saçılımı sağlar ve içi yapıyı yani granülariteyi gösterir. FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örneğin; periferik kanda lenfositler küçüktür ve az granülarite gösterir, monositler orta büyüklükte ve orta granülarite gösterirken, granülositler ise daha büyük ve daha fazla granülariteye sahiptir (78).

Çeşitli fotodedektörler ışığı yansıtıcı uygun aynalar kullanarak kemik iliği gibi kompleks hücre süspansiyonlarının multiparametrik analizleri yapılabilir. Multiparametrik analizlerde iki veya daha fazla renkli immunfloresan kullanılır. Genellikle iki renkli, yeşil floresan veren FITC ve kırmızı floresan veren PE kullanılmaktadır. Farklı floresan işaretli antikörlerin kullanılması aynı anda iki farklı parametrenin tayinine olanak sağlar (79).

3. OLGULAR VE METODLAR

3.1. Olgular

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı polikliniğine başvuran, yaşları 6-26 ay arasında olan toplam 33 çocuk alındı. Tüm olguların başlangıçta öyküleri alındı, fizik muayeneleri yapıldı. İmmun yetmezliği, malnütrisyonu, ilave bir hematolojik hastalığı, malignensisi, enfeksiyonu olanlar çalışmaya alınmadı. Tüm olguların CRP ve hemoglobin elektroforezleri değerlendirildi. CRP'si pozitif olanlar ve hemoglobinopatisi olanlar çalışmaya dahil edilmedi. Olgular tam kan sayımı, ferritin ve sTfR düzeyine göre 3 gruba ayrıldı.

Grup 1) Prelatent ve latent demir eksikliği olanlar

Hb 11gr/dl'nin üstünde, MCV 72 fl'nin üstünde ve ferritini 10ng/ml'nin altında ve/veya sTfR düzeyi 30 nmol/L'nin üstünde olanlar

Grup 2) Demir eksikliği anemisi olanlar

Hb 11gr/dl'nin altında, MCV 72 fl'nin altında ve ferritini 10 ng/ml'nin altında ve/veya sTfR düzeyi 30 nmol/L'nin üstünde olanlar

Grup 3) Sağlıklı çocuklar

Hb 11gr/dl'nin üstünde, MCV 72 fl'nin üstünde ve ferritini 10 ng/ml'nin üstünde ve/veya sTfR 30nmol/L altında olanlar

3.2. Metodlar

EDTA içeren tüplere alınan örneklerde tam kan sayımı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Coulter MaxM (Beckman- Coulter, Inc, USA) otomatik kan sayım cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ferritin düzeyi Laison marka cihazla, immunoluminometrik yöntemle ölçüldü. Serum TFR düzeyi; ELISA yöntemiyle (Quantikine IVD Soluble Transferrin receptor ELISA R-D Systems Inc. Catalog Number DTFR1) kantitatif olarak değerlendirildi. sTfR/ Ferritin indeksi; sTfR düzeyinin, ferritinin logaritmasına bölünmesiyle elde edildi.

3.2.1. Mononükleer hücrelerin ayrılması

- EDTA'lı tüpe 2 cc kan alındı.
- Kan 1:1 PBS (phosphate buffered saline) ile dilue edildi.
- Tüp içerisine 3 ml Histopaque 1.077 kondu. Dilue edilmiş 6 ml kan Histopaque üzerine katmanlaştırıldı.
- 700 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Lenfositler santrifüj tüpünde toplandı, PBS ile 10 ml'ye tamamlanarak 700 g'de santrifüj edildi.
- Lenfositler 3 kez yıkandı.
- RPMI-1640 + %10 FCS (Fetal calf serum) içeren medium ile lenfosit sayısı 4×10^6 hücre/ml olarak ayarlandı.

3.2.2. PHA ile stimülasyon

Mononükleer hücreler ayrıldıktan sonra 1 µg/ml PHA eklenerek stimüle edildi. Kültürler %5 CO₂'de, 37 C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda akış sitometrik analiz ile hücre yüzey antijenleri incelendi.

3.2.3. Akış sitometrik analiz

CD3 düzeyi ve CD3 pozitif hücrelerdeki CD71 ekspresyonlarının tayini, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan dört renk histogram çalışma özelliğine sahip akış sitometresinde (Epics XL-MCL, Coulter Electronics INC, FL,USA) ayrılan mononükleer hücrelerin maksimum 2 saat içinde analiz edilmesi ile gösterildi. Mononükleer hücrelerde hem PHA ile stimüle edilmesinden önce hem de sonra akış sitometrik analiz yapıldı.

3.2.4. Monoklonal antikorlar

Akış sitometresi ile yapılan ölçümlerde lenfositlerin üzerinde yer alan adezyon moleküllerinin gösterilmesi amacıyla insan CD3 antijenine karşı geliştirilmiş olan floresan ile direk bağlı mouse monoklonal antikor (antiCD3 R-PE) ve insan CD71 antijenine karşı geliştirilmiş olan mouse monoklonal antikor (antiCD71 FITC) kullanıldı.

Akış sitometresi ile yapılacak analizler için mononükleer hücreler ayrıldı. En geç 30 dakikada Hematoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı. 100 µl mononükleer hücre örneği üzerine 10 µl CD3 monoklonal antikor ve 5 µl CD71 monoklonal antikor konuldu. İzotipik kontrol tüpünde, 100µl mononükleer hücre örneği üzerine 10'ar µl negatif izotipik kontroller eklendi. Örnekler 15 dakika süre ile karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra örnekler üzerine 500µl PBS eklendi ve takiben akış sitometresi ile ölçümler yapıldı.

Akış sitometresi 15 mikron çapındaki boncuklar (Immunocheck, Coulter Electronics, Inc, FL, USA) ile kalibre edildikten sonra örnekler cihaza verildi. Öncelikle lenfositler büyüklük ve granülaritelerine göre hücrelerin dağılımını gösteren ön(forward) ve 90 derecelik yan saçının

(right-angle light scatter) histogramı kullanılarak diğer hücrelerden ayrıldı ve lenfositler ile ilgili analizler belirlenen bu bölge üzerinde gerçekleştirildi. İzotipik kontroller %2 ayarları yapıldıktan sonra CD71 FITC/ CD3 R-PE tüpünde hem CD3 oranı hem de CD3 pozitif hücrelerdeki CD71 ekspresyon miktarı tayin edildi. Bu işlem mononükleer hücreleri hem PHA ile stimüle etmeden önce hem de sonra uygulandı. Hücre başına düşen ortalama antijen yoğunluğunun (molekül miktarının) gösterilmesinde indirekt bir parametre olan ortalama kanal numarası (mean fluorescence intensity, MFI) kullanıldı.

3.3. İstatistik

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 10.0, SPSS Inc., U.S.A) kullanılarak gerçekleştirildi. Değişik zaman dilimlerinde (T0-3) alınan örneklerdeki molekül yüzde ve ekspresyonlarının analizinde normal dağılıma uygunlukları değerlendirildi ve normal dağılımın sağlanamadığı durumlarda non-parametrik "Wilcoxon's signe-rank test" kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların analizi için Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. Anlamlı değerler; 0.05 den küçük "p" değerleri olarak kabul edildi. Parametreler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için Pearson Korelasyon analizi kullanıldı. Metin içerisinde ve tablodaki değerler ortalama \pm standart deviasyon (SD) olarak verildi.

4. SONUÇLAR

Çalışmaya alınan çocukların ortalama yaşları, 7 ile 26 ay (ortalama 14.5 ± 5.2 ay) arasındaydı. Prelatent-latent demir eksikliği olan grupta (Grup 1); 5 kız, 1 erkek toplam 6 hasta; demir eksikliği anemisi olan grupta (Grup 2);12 kız 5 erkek toplam 17 hasta vardı. Kontrol grubu (Grup 3); 6 kız, 4 erkek toplam 10 çocuktan oluştu (Bkz Tablo 4.1). Gruplar arasında yaş, cinsiyet ile boy ve kilo persentili açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Bkz Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Grupların cinsiyet dağılımı

CİNSİYET	KIZ	ERKEK	TOPLAM
GRUP 1	5	1	6
GRUP 2	12	5	17
GRUP 3	6	4	10

Tablo 4.2: Grupların yaş, boy ve kilo persentillerinin karşılaştırılması

	YAŞ \pm SD	p	Boy persentili	p	Kilo persentili	p
GRUP 1	15.6 ± 6.1		% 50		% 25-50	
GRUP 2	14.7 ± 5.9	0.87	%25-50	0.43	% 25-50	
GRUP3	13.5 ± 3.3		%75		% 50	0.55

Ortalama Hemoglobin; grup 1'de 11.9 ± 0.61 , grup 2'de 9.8 ± 0.84 , grup 3'de 11.7 ± 0.63 idi. Hemoglobin değerleri için; Grup 1 ve 2 ile grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark saptanırken ($p < 0.001$ ve $p = 0.001$), grup 1 ve 3 arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Anagrup (grup 1 ve 2 birlikte, anemi olsun veya olmasın demir eksikliği olan hastalar) ile kontrol grubu arasında anlamlı fark vardı ($p = 0.001$).

Ortalama MCV ; grup 1'de 74.6 ± 5 , grup 2'de 64 ± 6.5 , grup 3'de 78.8 ± 3.4 idi. Grup 1 ve 2 ile Grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark saptanırken ($p = 0.002$ ve $p < 0.001$), grup 1 ve 3 arasında anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.07$). Anagrup ile grup 3 arasında anlamlı fark vardı ($p < 0.001$).

Ortalama RDW; grup 1'de $\% 14 \pm 1.1$, grup 2'de 17.1 ± 2.9 , grup 3'de 12.5 ± 0.72 idi. Tüm gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Gruplar arasındaki p değerleri: Grup 1 ve 2 $p = 0.003$, grup 2 ve 3 $p < 0.001$, grup 1 ve 3 $p = 0.07$ bulundu. Anagrup ile kontrol grubu arasında da anlamlı fark vardı ($p < 0.001$).

Ortalama trombosit sayısı; grup 1'de 387833 ± 63546 , grup 2'de 431882 ± 195495 , grup 3'de 455700 ± 123108 idi. Tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Anagrup ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamadı ($p = 0.5$).

Ortalama ferritin düzeyi; grup 1'de 22.2 ± 15.7 , grup 2'de 12.1 ± 10.1 , grup 3'de 35.8 ± 33.3 idi. Grup 1 ve 2 ile grup 1 ve 3 arasında fark saptanmazken ($p = 0.22$ ve $p = 0.71$), grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark bulundu ($p = 0.002$). Anagrup ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.13$).

Transferrin satürasyonunun ortalaması; grup 1'de 10.6 ± 2.5 , grup 2'de 6.3 ± 2.7 , grup 3'de 30.6 ± 21.8 idi. Tüm gruplar arasında anlamlı

fark saptandı. Gruplar arasındaki p değerleri: Grup 1 ve 2 p=0.02, grup 1 ve 3 p= 0.02, grup 2 ve 3 p< 0.001 bulundu. Anagrup ve kontrol grubu arasında da anlamlı fark vardı (p<0.001).

STfR düzeyinin ortalaması; grup 1'de 41.6 ± 5.6 , grup 2'de 53 ± 16 , grup 3'de, 22.4 ± 10.2 idi. Grup 1 ve 3 ile grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark saptanırken (p<0.001 ve p= 0.001) grup 1 ve 2 arasında anlamlı fark saptanmadı (p= 0.17). Anagrup ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu (p<0.001).

STfR/ferritin indeksi ortalaması; grup 1'de 39.5 ± 15.8 , grup 2'de 60.6 ± 36.5 , grup 3'de 16.7 ± 9.1 idi. Grup 1 ve 3 ile grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark saptanırken (p= 0.001 ve p<0.001), grup 1 ve 2 arasında fark saptanmadı (p=0.20). Anagrup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark vardı (p<0.001). (Bkz Tablo 4.3)

Tablo 4.3: Grupların laboratuvar parametrelerinin karşılaştırılması

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	p (1 ve 2)	p (1 ve 3)	p (2 ve 3)
Hb \pm SD	11.9 \pm 0.6	9.8 \pm 0.8	11.7 \pm 0.6	<0,001	0.56	<0,001
MCV \pm SD	74.6 \pm 5	64 \pm 6.5	78.8 \pm 3.4	0.002	0.07	<0.001
RDW \pm SD	14 \pm 1.1	17.1 \pm 2.9	12.5 \pm 0.7	0.003	0.07	<0.001
PLT \pm SD	387833 \pm 63546	431882 \pm 195495	455700 \pm 123108	0.82	0.31	0.71
Ferritin \pm SD	22.2 \pm 15.7	12.1 \pm 10.1	35.8 \pm 33.3	0.22	0.71	0.002
TS \pm SD	10.6 \pm 2.5	6.3 \pm 2.7	30.6 \pm 21.8	0.02	0.02	<0.001
IfR \pm SD	41.6 \pm 5.6	53 \pm 16	22.4 \pm 10.2	0.17	<0.001	<0.001
IfR/ ferritin indeksi \pm SD	39.5 \pm 15.8	60.6 \pm 36.5	16.7 \pm 9.1	0.2	<0.001	0.001

CD3 giriş değeri (PHA ile stimüle edilmeden önce yapılan akış sitometrik analiz) ortalaması; grup 1'de 66.7 ± 12 , grup 2'de 63.7 ± 7.8 , grup 3'de 69.6 ± 7.3 idi (Bkz. Tablo 4.4). Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Anagrup ile kontrol grubu arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p=0.08$).

CD3 giriş değeri ortalama kanal numarası (CD3 giriş minX) ortalaması; grup 1'de 17.3 ± 19.2 , grup 2'de 32.2 ± 23.3 , grup 3'de 25.5 ± 21.3 idi. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

CD3 çıkış değeri (PHA ile stimüle edildikten sonra yapılan akış sitometrik analiz) ortalaması; grup 1'de 58.5 ± 10.5 , grup 2'de 48.6 ± 10.5 , grup 3'de 70.7 ± 7.8 idi. Grup 1 ve 3 ile grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark saptanırken ($p=0.02$ ve $p<0.001$), grup 1 ve 2 arasında anlamlı fark saptanmadı ($p= 0.62$) (Bkz. Tablo 4.4). Anagrup ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0.000$).

CD3 çıkış değeri ortalama kanal numarası (CD3 çıkış minX) ortalaması; grup 1'de 30.7 ± 23.3 , grup 2'de 23.2 ± 16.1 , grup 3'de 21.8 ± 19.9 idi. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

CD3 pozitif (mononükleer hücrelerdeki) CD71 giriş değeri (PHA ile stimüle edilmeden önce yapılan akış sitometrik analiz) ortalaması; grup 1'de 1.6 ± 0.67 , grup 2'de 2.1 ± 1.2 , grup 3'de 1.4 ± 0.66 idi. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Bkz. Tablo 4.4). Anagrup ve kontrol grubu arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p= 0.22$).

CD3 pozitif CD71 çıkış değeri (PHA ile stimüle edildikten sonra yapılan akış sitometrik analiz) ortalaması; grup 1'de 29.6 ± 11.8 , grup 2'de 34 ± 10.3 , grup 3'de 31.8 ± 14.1 idi. Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Bkz. Tablo 4.4). Anagrup ve kontrol grubu arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p=0.95$).

CD3 pozitif CD71 giriş ve çıkış değeri ortalama kanal numarası; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

CD3 giriş ve çıkış değerleri arasında PHA proliferatif yanıt olarak grup 2'de ve anagrupta anlamlı fark saptanırken ($p < 0.001$), grup 1 ve 3'de anlamlı fark bulunmadı ($p = 0.75$ ve $p = 0.79$). CD3 minX giriş ve çıkış değerleri açısından sadece grup 2'de anlamlı fark saptandı ($p = 0.03$ ve $p = 0.002$).

CD3 pozitif CD71 giriş ve çıkış değerleri arasında PHA'e proliferatif yanıt olarak her 3 grupta da anlamlı fark (artış) saptandı. Gruplardaki p değerleri sırasıyla; grup 1'de $p = 0.02$, grup 2'de $p < 0.001$, grup 3'de $p = 0.005$ idi. Anagrupta da anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$). CD3 pozitif CD71 minX giriş ve çıkış değerleri arasında grupların hiçbirinde fark bulunmadı.

Tablo 4.4: Grupların CD3 ile CD3⁺ mononükleer hücrelerdeki CD71 giriş ve çıkış değerlerinin karşılaştırılması

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	P(1ve2)	P (1ve3)	P (2ve3)
CD3 giriş değeri(%)	66.7±12	63.7±7.8	69.6±7.3	0.86	0.49	0.06
CD3 çıkış değeri (%)	58.5±10.5	48.6±10.5	70.7±7.8	0.62	0.02	<0.001
CD3 ⁺ CD71 giriş değeri (%)	1.6±0.67	2.1±1.2	1.4±0.66	0.47	0.71	0.17
CD3 ⁺ CD71 çıkış değeri (%)	29.6±11.8	34±10.3	31.8±14.1	0.43	0.71	0.78

5. TARTIŞMA

Serum TfR düzeyinin, total eritropoez ve DE için en duyarlı tetkik olduğu gösterilmiştir (10). sTfR düzeyi ve sTfR/ferritin indeksi DE'nin ayırıcı tanısında güvenilir tanı yöntemleri olarak sunulmuştur (7,69,80,81). Bu çalışmada; sTfR düzeyi ölçüldü ve sTfR/ ferritin indeksi hesaplandı. Geleneksel laboratuvar metodları anemi varlığında demir eksikliğinin tanısı için yeterlidir. Fakat diğer kronik hastalıkların varlığında veya subklinik DE'nin değerlendirilmesinde kısıtlılıkları vardır. Mast AE ve arkadaşlarının(82) yaptığı bir çalışmada; DEA'de kemik iliğinde demir boyası veya demir tedavisine cevap ile ferritin ve sTfR düzeyinin duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirilmiştir. Ferritinin duyarlılığı %25, özgüllüğü %98; sTfR'nün duyarlılığı %92, özgüllüğü %84 bulunmuştur. Serum ferritini özgüllüğü yüksek fakat duyarlılığı düşük bir tetkik metodudur. Bu nedenle sTfR'ü ile birlikte ölçümü önerilmektedir (83). Bu şekilde DE'nin tanısında, kemik iliği demir boyaması kadar hassas sonuç alınabileceği belirtilmektedir. Çalışmamızda DE'nin tanısında ferritinin yetersiz olduğu saptandı. Ferritin düzeyi değerlendirildiğinde kontrol grubu ile latent-prelatent DE arasında fark yokken; sTfR ve sTfR/ferritin indeksi ile değerlendirildiğinde anlamlı fark saptandı. sTfR düzeyi; hemoglobin, MCV, RDW, transferrin saturasyonu, CD3 çıkış değeri ve CD3 pozitif mononükleer hücrelerdeki CD71 giriş değeri ile uyumlu bulundu. Ferritinin akut faz reaktanı olması nedeniyle, özellikle anemi gelişmeden önceki DE'nin değerlendirilmesinde sTfR düzeyinin

bilinmesi gerektiği ve bu şekilde DE'e bağlı gelişebilecek sonuçların önlenebileceği sonucuna varıldı.

DEA'de hücrel immunitede defekt ve hücrel öldürme fonksiyonunda azalma bildirilmiştir. Fakat anemi gelişmeden önceki DE'nin immunitedeki etkisini değerlendiren çalışmalar yetersiz ve sonuçlar çelişkilidir. Macdougall ve arkadaşları(84)'nın yaptığı çalışmada, 7 latent DE ve 20 DEA olan çocukta immunglobulin konsantrasyonları ve lenfosit ile nötrofil fonksiyonları değerlendirilmiştir. Hem DEA hem de latent DE'de T lenfosit fonksiyonunu gösteren testlerde (invivo gecikmiş hipersensitiviteyi değerlendiren deri testleri ile invitro PHA ve candida antijeni ile stimülasyona cevabı gösteren testler) bozulma gösterilmiştir. Bu sonuç; "immun fonksiyonlardaki değişiklik, DE'nin erken bulgusudur" şeklinde yorumlanmıştır. Bulgular, demir tedavisi başladıktan 2-3 ay sonra normale dönmüştür. Bunun aksine; Grosch-Worner ve arkadaşları (85)'nin yaptığı çalışmada; 23 hafif DEA, 22 latent DE olan çocukta lenfositlerin mitojenlere olan cevabına bakılmış, lenfosit fonksiyonlarında ve sayısında fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda, T lenfositlerin PHA'e proliferatif cevabının, DEA'de olduğu gibi prelatent ve latent DE'de de yetersiz olduğu saptanmıştır. Bu konuyu aydınlatan, daha fazla olguyu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Demirin hücre proliferasyonuna etkili olduğu bilinmektedir. TfR; bütün hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen bir transmembran proteinidir. Hızlı bölünen hücreler büyüme ve metabolizmaları için demire ihtiyaç duyarlar ve TfR ekspresyonunu arttırırlar. T lenfositler, TfR, demir ve hücre proliferasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. TfR'nü bloke eden antikörlerin hücre büyümesini ve DNA sentezini inhibe ettiği tesbit edilmiştir (4,12). İnvitro lenfosit

kültürlerinde, TfR bloke edildiğinde veya kültür ortamından demir elimine edildiğinde, proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir (86,87). Çalışmamızda; mononükleer hücreler PHA ile stimüle edildi ve akış sitometrik analiz ile stimülasyondan önce ve sonra T lenfositlerin yüzeyindeki TfR ekspresyonuna bakıldı. Üç grupta da T lenfositlerin yüzeyindeki TfR ekspresyonunda istatistiki olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Fakat gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu çalışma sonuçları, Pattanapanyasat K(16)'nın yaptığı çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Bu çalışmada 10 kontrol, 7 homozigot β -talasemi ve 5 demir eksikliği anemisi olan kişi alınmış ve mononükleer hücreleri PHA ile stimüle edilerek, akış sitometrik analiz ile hücre yüzeyindeki TfR ve IL2 reseptör sayısı değerlendirilmiştir. Üç grupta da PHA ile stimülasyondan sonra, lenfositlerde TfR ve IL2 reseptör seviyesinde artış olmuş, fakat gruplar arasında fark bulunmamıştır. Lenfositlere total olarak bakılmış, T ve B lenfosit ayrımı yapılmamıştır. Kınık ve arkadaşları(15)'nin yaptığı çalışmada; 9 ay 16 yaş arasındaki toplam 43 DEA, 11 β -talasemi taşıyıcısı ve 10 kontrol alınmış. Periferik lenfositlerin CD71 ekspresyonu DEA olan grupta anlamlı olarak düşük bulunmuş fakat PHA ile stimülasyon uygulanmamıştır. Eritroblastlarda TfR sayısı DEA olanlarda normal kişilerle karşılaştırıldığında önemli oranda yüksek olduğu gösterilmişken (88,89); bu çalışmada lenfositlerdeki TfR ekspresyonunun azalmış bulunmasının, DEA'de bildirilen azalmış sellüler immunitenin sorumlusu olabileceği belirtilmiştir. Yine lenfositlerde T veya B ayrımı yapılmamıştır. Aydar ve arkadaşları(14)'nin yaptığı çalışmada ise; 10 DEA olan kişi alınmış ve lenfositler PHA ile uyarıldığında, DEA'de uyarılmış lenfositlerde TfR ekspresyonunun önemli ölçüde az olduğu bulunmuştur. TfR ekspresyonu ile ferritin arasında önemli korelasyon olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda CD3 pozitif CD71 giriş değeri ve minX ile MCV, RDW, sTfR, sTfR/ferritin indeksi arasında korelasyon varken, ferritin ve transferrin saturasyonu ile korelasyon saptanmamıştır. CD3 pozitif CD71 çıkış değeri ile hiçbir parametre arasında korelasyon saptanmamıştır. Son iki çalışmanın aksine, çalışmamızda T lenfositlerin TfR ekspresyonunda PHA ile stimülasyondan önce ve sonra, DE ve DEA olan grupta anlamlı fark saptamadık.

Bu çalışmada önceki çalışmalardan farklı olarak mononükleer hücreler PHA ile uyarıldıktan sonra, T lenfosit proliferasyonu ve T lenfositlerde TfR ekspresyonu değerlendirildi. Anemi gelişmeden DE olan olgular da çalışmaya dahil edildi. T lenfosit proliferasyonunun anemi gelişmeden önceki DE evrelerinde de etkilendiği gösterilirken, DE'de T lenfositlerdeki TfR ekspresyonunda fark saptanmadı. Bu sonuç; T lenfosit proliferasyonundaki etkilenmede, TfR dışındaki faktörlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. DEA'de meydana gelen hücresel immunitedeki yetersizliğin mekanizması tam aydınlatılamamıştır. TfR ile ilişkili veya TfR'den bağımsız mekanizmalarla oluşabilir. Bu konuda daha fazla olguyu içeren çalışmaların yapılması, konunun daha iyi aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

ÖZET

DE tek başına en yaygın nutrisyonel eksikliklerdir. Gelişmiş ülkelerde DEA prevalansı son yıllarda azalmakla birlikte subklinik DE prevalansı hala önemli düzeydedir. Gelişmekte olan ülkelerde her ikisi de ciddi bir sorundur.

Demir bütün hücreler için hayati bir elementtir. Özellikle metabolik olarak aktif ve proliferen olan hücrelerde (timositler, aktive T hücreleri gibi) fonksiyonu daha önemlidir. DE ve enfeksiyonlar arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli deneysel çalışmalar yapılmıştır. DEA'nin enfeksiyonlarla ilişkisi kesin olmamakla birlikte, hücresel immunitede defekt ve fagositozla bakteriyel öldürme fonksiyonunda azalma bildirilmiştir. Subklinik DE'nin immuniteye etkisi ile ilgili yapılan araştırma sonuçları çelişkilidir ve DEA'de meydana gelen immun defektin mekanizması aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada; mononükleer hücreler PHA ile stimüle edilerek, hem subklinik DE'de hem de DEA'de stimülasyondan önce ve sonra, T lenfositlerinin mitojene cevabı ve T lenfositlerin yüzeyindeki Tfr ekspresyonu incelendi. T lenfositlerin mitojene olan cevabı, hem DEA'de hem de DE'de anlamlı olarak düşük saptandı. PHA ile T lenfositlerin CD71 (Tfr belirleyicisi) ekspresyonunda, üç grupta da anlamlı artış oldu. Fakat demir eksikliği olan olgularda fark saptanmadı.

Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, Tfr ekspresyonu mononükleer hücrelerde değil, T lenfositlerde değerlendirildi ve anemi gelişmeden önceki DE'de göz önünde bulunduruldu. T lenfosit proliferasyonun prelatent ve latent DE evrelerinde de etkilendiği

gösterildi. Fakat TfR ekspresyonunda fark saptanmadı. Bu sonuç; T lenfosit proliferasyonundaki etkilenmede, TfR dışındaki faktörlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. DEA'de hücrel immunitedeki etkilenmenin hangi mekanizmalarla geliştiği ve demir eksikliğinin erken dönemlerinde immunitenin etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi için daha fazla klinik ve epidemiyolojik araştırmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Fairbanks VF, Beutler E. Iron metabolism. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps JJ(eds). William's heamatology New York : Mc Graw-Hill, 1995 :369-380
2. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. TfR and TfR - ferritin index identify healty subject with subclinical iron deficits. Blood 1998, 92(8); 2934-9.
3. Namanjeet Ahluwalia. Diagnostic Utility of serum Transferrin Receptors Measurement in Assessing Iron Status. Nutrition Reviews, May 1998:(1)133-141
4. Cazzola M, Bergamaschi G, Dezza L, Arasio P. Maniplations of cellular iron metabolizm for modulating normal and malignant cell proliferation:achivement and prospects. Blood 1989;75:1903-1919.
5. Dallman PR. Iron deficiency and the immune response. Am J Clin Nutr 1987; 46:329.
6. Baynes RD. Refining the assessment of body iron status. Am J Clin Nutr 1996;64:793-4
7. Baynes RD. Assessment of iron status . Clin Biochem 1996;29:209-15
8. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. Annu Rev Med 1993;44:63-74
9. Bender JG, Underzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH et al. Idendification and comparison of CD34-positive cell and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor cytometry. Blood 1991;77:2591-2596

10. Sandoval M. Multiparametric analysis of iron deficiency anemia. *Medicina(B.Aires)* 1999;59(6):710-6
11. Baynes RD, Skikne BS, Cook JD. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status. *J Nutr Biochem* 1994;5:322-30
12. Musgrove E, Taylor I, Rugger C, Hedley D. TfR expression during exponential and plateau phase growth of human tumour cells in culture. *J Cell Physiol* 1984; 118: 6-12
13. May WS JR, Cuatrecas P. Transferrin receptor: Its biological significance. *J Membrane Biol* 1985; 88: 205-215
14. Aydar S, Büyükkeçeci F, Kulalı B. The importance of Transferrin receptor in Proliferation of Lymphocytes in iron deficiency Turk J of heamatology 1998 ; 15:77-81
15. Kınık ST, Tuncer AM, Altay C. Transferrin receptor on peripheral blood lymphocytes in iron deficiency anemia. *Br J Haematology* 1999 ; 104(3) :494-8
16. Pattanapanyasat K. Exspression of cell surface transferrin receptor following invitro stimulation of peripheral blood lymphocytes in patient with beta-thalassemia and iron deficiency anaemia. *Eur J Haematol* 1990 ;44(3):190-5
17. Bagchi K, Mohanram M, Reddy V. Humoral immune response in children with iron deficiency anaemia. *Br Med J* 1980 May 24; 280: 1249-51.
18. Gillespie S, Mason JB, Kevany J, eds. Controlling Iron deficiency. Geneva, Switzerland: United Nations Administrative Committee on Coordination/ Subcommittee on Nutrition; 1991. State of the Art Series Nutrition Policy Discussion Paper No. 9.

20. Aguayo VM. School-administered weekly iron supplementation-effect on the growth and hemoglobin status of non-anemic Bolivian school-age children. A randomized placebo-controlled trial. *Eur J Nutr* 2000 Dec; 39(6) :263-9.
21. Lozoff B, Brittenham GM, Viteri FE, Wolf AW, Urritia JJ. Developmental deficits in iron deficient infants: Effects of age and severity of iron lack. *J Pediatr* 1982;101:948
22. Gökteş Y, Yıldırım Y, Tanyer G, Dallar Y. Sağlıklı çocuklarda demir eksikliği sıklığı. 41. National Pediatric Congress. 1997 Van, Turkey.
23. Okur V, Akman M, Demirkol A, Hallaç N, Say A. Haseki Hastanesi Pediatri polklineğine başvuran 6 ay-14 yaş arası çocuk ve adölesanlarda anemi sıklığının belirlenmesi ve sosyodemografik özellikler ile anemi ilişkisi. 35. National Pediatric Congress (Turkish Pediatric Society) 19-23 May 1999 Ankara, Turkey.
24. Soylu H, Özgen Ü, Babalıoğlu M, Aras Ş, Sazak S. Iron deficiency and iron deficiency anemia in infants and Young Children at Different Socioeconomic Groups in İstanbul. *Turk J Haematol* 2001; 18(1): 19-25.
25. Koç A, Kösecik M, Vural H, Erel Ö, Ataş A, Tatlı M.M. The frequency and etiology of anaemia among children 6-16 years of age in the southeast of Turkey. *Turk J Pediatr* 2000; 42: 91-5.
26. Andrews NC. Iron metabolism and absorption. *Rev Clin Exp Hematol* 2000 December; 4(4): 283-301.
27. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388:482-8.
28. Piomelli S, Seaman C, Kapoor S: Lead induced abnormalities of porphyrin metabolism. The relationship with iron deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1987; 514:278.

29. McKie AT, Wehr K, Simpson RJ, Peters TJ, Hentze MW, Farzaneh F. Molecular cloning and characterisation of a novel duodenal-specific gene implicated in iron absorption. *Biochem Soc Trans* 1998; 26:S264.
30. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999; 21:195-9.
31. Ponka P, Schulman HM: Regulation of heme biosynthesis: distinct features in erythroid cells. *Stem Cells* 1993; 11(Suppl 1):24.
32. Inman RS, Wessling-Resnick M: Characterization of transferrin independent iron transport in K562 cells. Unique properties provide evidence for multiple pathways of iron uptake. *J Biol Chem* 1993;268:8521
33. Hamazaki S, Glass J: Non-transferrin dependent Fe uptake in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral lymphocytes. *Exp Hematol* 1992; 20:436.
34. Larrick JW, Cresswell P: Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. *J Supramolecular Structure* 1979; 11:579
35. White S, Taetle R, Seligman PA, Rutherford M, Trowbridge IS: Combinations of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies inhibit human tumor cell growth in vitro and in vivo: evidence for synergistic anti-proliferative effects. *Cancer Res* 1990; 50:6295.
36. Lederman HM, Cohen A, Lee JW, Freedman MH, Gelfand EW. Deferoxamine: a reversible S phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* 1984; 64:748.
37. Gilgen D, Mascie-Taylor CG. The effect of antihelminthic treatment on helminth infection and anaemia. *Parasitology* 2001 Jan; 122(1): 105-10.

38. Hentze MW. Translational control by iron responsive elements. Progress in iron research. Edited by C Hershko et al. Plenum Press, New York, 1994 p 119-124.
39. Choe YH, Kwan YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. Helicobacter pylori-associated iron deficiency anaemia in adolescent female athletes. J Pediatr 2001 Jul; 139(1): 100-4.
40. Konno M, Muraoka S, Takahashi M, Imai T. Iron deficiency anemia associated with Helicobacter pylori gastritis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000 Jul; 31(1):52-6.
41. Kabakuş N, Yılmaz B, Caliskan U. Investigation of platelet aggregation by impedance and optic methods in children with iron deficiency anaemia. Haematologia 2000;30 (2) :107-15.
42. Kurekci AE, Atay AA, Sarici SU, Zeybek C, Koseoglu V, Ozcan O. Effect of iron therapy on whole blood platelet aggregation in infants with iron deficiency anaemia. Thromb Res 2000 Mar 1: 97(5): 281-5
43. Tekin D, Yavuzer S, Tekin M, Akar N, Cin S. Possible effects of antioxidant status on increased platelet aggregation in childhood iron deficiency anaemia. Pediatr Int 2001 Feb; 43(1) : 74-7.
44. Oski FA, Honig AS, Helu B, Howanitz P. Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron deficient infants. Pediatrics 1983; 71: 877.
45. Lozoff B, Jimenez E, Wolf A: Long term developmental outcome of infants with iron deficiency. N Engl J Med 1991; 325:687.
46. Walter T, De Andraca I. Iron deficiency anaemia: adverse effects of infant psychomotor development. Pediatrics 1991;84:7.
47. Sheard N: Iron deficiency and infant development. Nutr Rev 1994; 52:137.

48. Morley R, Abbott R, Fairweather- Tait S, MacFadyen V, Stephenson T, Lucas A. Iron for fortified follow on formula from 9-18 months improves iron status but development or growth: a randomised trial. *Arch Dis Child* 1999;81:247-252.
49. Anezaki T, Yanagisawa K, Ibayashi K, Miyatake T. A patient with severe iron deficiency anaemia and memory disturbance. *Intern Med* 1992; 31:1306.
50. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf Aw. Poorer behavioral and developmental out come more than after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* 2000 Apr ; 105 (4) :E51
51. Andelman MB, Sered BR. Utilization of dietary iron by term infants. *Am J Dis Child* 1966;111:45.
52. Mackay HMM. Anaemia in infancy: Its prevalance and prevention. *Am J Dis Child* 1928;3:117.
53. Summers MR, Jacobs A. Iron uptake and ferritin synthesis by peripheral blood leucocytes from normal subjects and patients with iron deficiency and the anaemia of chronic disease. *Br J Haematol* 1976 ;34: 221-229.
54. Kuvibidila S, Dardanne M, Savino W, Lepault F. Influence of iron deficiency anemia and selected thymus function in mice: Thymulin biological activity T-cell subsets, and thymocyte proliferation. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:228.
55. Helyar L, Sherman AR. Iron deficiency and interleukin 1 production by rat leukocytes. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:346.
56. Piedras J, Alcocer-Varela J, Lopez-Karpovitz X, Cardenas M. Decreased interleukin -2 production by peripheral blood cells iron deficient children. *Blood* 1987;70:103a.
57. Omara FO, Blakley BR. The effects of iron deficiency and iron overload on mediated immunity in the mouse. *Br J Nutr* 1994 Dec; 72(6):899-909.

58. Kuvibidila SR, Kitchens D, Baliga BS. In vivo and in vitro iron deficiency reduces protein kinase C activity and translocation in murine splenic and purified T cells. *J Cell Biochem* 1999 Sep 1;74(3): 468-78.
59. Chandra RK. Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. *J Pediatr* 1975;86:899.
60. Chandra RK. Reduced bacteriocidal capacity of polymorphs in iron deficiency. *Arch Dis Child* 1973;48:864.
61. Yetgin S, Altay C, Ciliv G, Laleli Y. Myeloperoxidase activity and bacteriocidal function of PMN in iron deficiency. *Acta Haematol* 1979;61:10, Laboratory Findings.
62. Murakawa H, Bland CE, Willis ST, Dallman PR. Iron deficiency and neutrophil function: Different rates of correction and depressions in oxidative burst and myeloperoxidase activity after iron treatment. *Blood* 1987;69:1464.
63. Omara FO, Blakley BR. The Ig M and IgG antibody responses in iron deficient and iron loaded mice. *Biol Trace Elem Res* 1994 Oct-Nov; 46(1-2) :155-61.
64. Mocan H, Yildiran A, Orhan F, Erduran E. Breath holding spells in 91 children and response to treatment with iron. *Arch Dis Child* 1999;81:261-262.
65. Oski FA, Honig AS. The effects on the developmental scores of iron-deficient infants. *J Pediatr* 1978;92:21-5
66. Alvares JF, Oak JL, Pathare AV. Evaluation of cardiac function in iron deficiency anaemia before and after total dose iron therapy. *J Assoc Physicians India* 2000 Feb; 48(2) .204-6.
67. Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Cook JD. Characterization and quantitation of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain-specific antibodies. *Blood* 1993; 81: 234-238

68. Baynes RD, Skikne BS, Cook JD. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status. *J Nutr Biochem* 1994; 5:322-30.
69. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD: Serum transferrin receptor: A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75(9): 1870-6.
70. Debra L. Bogen, Anne K. Duggan, George J. Dover, Modena H. Wilson. Screening for Iron Deficiency Anaemia by Dietary History in a High-Risk Population. *Pediatrics* 2000 June; 105(6): 1254-9.
71. Barton JC. Intravenous iron dextran therapy in patients with iron deficiency and normal renal function who failed to respond to did not tolerate oral iron supplementation. *Am J Med* 2000 Jul; 109(1): 27-32.
72. Nutrition CO: Iron supplementation for infants. *Pediatrics* 1976; 58:765.
73. Kohli-Kumar M. Screening for anemia in children: AAP recommendations--a critique. *Pediatr* 2001 Sep; 108(3): E56.
74. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Iron deficiency. In: Barnes LA, ed: *Pediatric Nutrition Handbook*. 3rd ed. Elk Grove Village IL: American Academy of Pediatrics:1992:227-236.
75. Norman A. Flow cytometry. *Med Phys* 1980; 7: 609.
76. Riley RS, Mahin EJ. *Flow Cytometry Clinical Applications ASCP National Meeting* Fall, Washington D.C. 1989; 3.
77. Cram LS, Bartholdi MF, Wheelles LL, Gray JW. Morphological analysis by scanning flow cytometry. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (eds). *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis*. London, Academic Press 1993; 164.

78. Pinkel D, Stovel R. Flow chambers and sample handling. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (eds). Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis. London Academic Press 1983; 78.
79. Hiebert RD, Sweet RG: Electronics for flow cytometers and sorters. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR (eds). Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis. London Academic Press 1983; 130.
80. Punnonen K, Irjala K, Ramajaki A: Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052.
81. Punnonen K, Irjala K, Ramajaki A: Iron deficiency anemia is associated with high serum levels of transferrin receptor. *Clin Chem* 1994; 40:774.
82. Mast AE, Blinder MA, Growski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem*. 1998 Jan; 44(1):45-51.
83. Means RT Jr, Allen J, Sears DA, Schuster SJ. Serum soluble transferrin receptor and the prediction of bone marrow aspirate iron results in a heterogeneous group of patients. *Clin Lab Haematol*. 1999 Jun; 21(3): 161-7.
84. Macdougall LG, Anderson R, McNab GM, Katz J. The immune response in iron deficient children : Impaired cellular defense mechanisms with altered humoral components. *J Pediatr* 1975 Jun;86(6):833-43.
85. Grosch-Worner I, Grosse-Wilde H, Bender-Gotze C, Schafer KH. Lymphocyte function in children with iron deficiency. *Klin Wochenschr* 1984 Nov 15;62(22):1091-3.

86. Teatle R. The role of transferrin receptors in hemapoetic cell growth. *Experimental Hematology* 1990; 18: 360-365.
87. Hedley D, Rugg C, Musgrove E, Taylor I. Modulation of transferrin receptor expression by inhibitors of nucleic acid synthesis. *Journal of Cellular Physiology* 1985; 124: 61-66.
88. Muta K, Nishimura J, Ideguchi H, Umemura T; Ibayashi H. Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. *American Journal of Heamatology* 1987; 25: 155-163.
89. Kuiper-Kramer PA, Huisman C.M.S, Van der Molen-Sinke J, Abbes A. Van Ejik. E.G. The expression of transferrin receptors on erythroblasts in anaemia of chronic disease, myelodisplastic syndromes and iron deficiency. *Acta Haematologica* 1997; 97: 127-131.