



T.C.

SAğLIK BAKANLIğI

SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ANTALYA EğİTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ

TİBBİ BİYOKİMYA

**BETA TALASEMİ MAJOR HASTALARINDA GHRELİN VE
DEMİR METABOLİZMASI ARASINDAKİ İLİşKİ**

Dr. Nihan Cansel SARKAYA

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANTALYA/2023



**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANTALYA EĞTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

**BETA TALASEMİ MAJOR HASTALARINDA GHRELİN VE DEMİR
METABOLİZMASI ARASINDAKİ İLİşKİ**

Dr. Nihan Cansel SARKAYA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayřegöl UĞUR KURTOĞLU

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANTALYA/2023

TEŞEKKÜR

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü'ndeki uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve kıymetli hayat tecrübelerinden faydalandığım, her zaman yanımda olan ve yanımda olduğunu hissettiren çok kıymetli tez danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Ayşegül UĞUR KURTOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen, bana yol gösterici olan Prof. Dr. Necat Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürem ve çalışma ortamımda yardımlarını gördüğüm, bilgi ve becerilerinden faydalandığım Prof. Dr. Esin Yılmaz, Prof. Dr. Güzin Aykal, Doç. Dr. Ayşenur Yeğin, Doç. Dr. Hamit Yaşar Ellidağ, Doç. Dr. Sibel Kulaksızoğlu, Doç. Dr. Özgür Aydın ve Başasistan Uzm. Dr. Seçkin Özgür Tekeli çok teşekkür ederim. Laboratuvarımızda birlikte çalıştığımız, tecrübeleriyle bize yol gösteren tüm uzman büyüklerime ve birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuvarıda birlikte çalışmaktan keyif aldığım laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak bu mesleğe sahip olmamda en büyük katkısı olan, eğitim hayatım boyunca bana destek olan, her zaman yanımda olduklarını hissettiren annem ve babama emekleri için çok teşekkür ederim. Ayrıca birlikte aynı yollardan geçtiğimiz, her zaman bana destek olan meslektaşım, abime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TALASEMİ	3
2.1.1. Hemoglobinin Yapısı	3
2.1.2. Beta Talasemiler	4
2.1.2.1. Beta talasemi hastalığında klinik bulgular:	5
2.1.2.2. Beta talasemi hastalarında tedavi:	7
2.2. HEPSİDİN	7
2.2.1. Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	9
2.2.2. Hepsidin Sentezini Etkileyen Faktörler	10
2.3. HIF2 ALFA	11
2.3.1. HIF Sentezinin Düzenlenmesi	12
2.3.2. HIF Sentezini Etkileyen Faktörler	14
2.4. GHRELİN	15
2.4.1. Ghrelin Sentezi	15
2.4.2. Ghrelin Sentezinin Düzenlenmesi	17
2.4.3. Ghrelinin Fizyolojik Etkileri	18
2.4.4. Ghrelin ve Demir Metabolizması Arasındaki İlişki	20
2.5. DEMİR METABOLİZMASI	21
2.5.1. Demir GİS Emilimi	22

2.5.2. Demirin GİS Emilimini Etkileyen Faktörler.....	23
2.5.3. Beta Talasemi Major Hastalığında Demir Metabolizması.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. HASTA VE KONTROL GRUBUNUN ÖZELLİKLERİ	26
3.2. LABORATUVAR ANALİZLERİ.....	27
3.2.1. Ghrelin Ölçümü.....	28
3.2.2. Hipoksi ile İndüklenen Faktör 2 Alfa (HIF 2 α)	28
3.2.3. Hepsidin Ölçümü	29
3.2.4. Demir Ölçümü.....	30
3.2.5. Doymamış Demir Bağlama Kapasitesi (UIBC).....	31
3.2.6. Total Demir Bağlama Kapasitesi (TDBK).....	31
3.2.7. Ferritin Ölçümü.....	31
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA	40
5.1. ÇALIŞMA KISITLILIKLARI	48
6. SONUÇLAR	49
7. KAYNAKLAR	51
8. ÖZGEÇMİŞ.....	57
9. ETİK KURUL ONAYI.....	58

KISALTMALAR

- AG:** Açıllanmış ghrelin
- AgRP:** Aguti ile ilişkili peptit
- ARNT:** Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator
- BMP:** Kemik morfojenik proteini
- CREB:** cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein
- DAG:** Des-açıl ghrelin
- DEA:** Demir eksikliği anemisi
- DMT1:** Divalan metal transporter
- EPO:** Eritropoietin
- ERFE:** Eritroferron
- Erk:** Ekstraselüler protein kinaz
- FIH:** HIF- α 'yı inhibe eden faktör
- GABA:** Gama-aminobütirik asit
- GDF-15:** Büyüme farklılaşma faktörü 15
- GHSR:** Büyüme hormonu sekretagog reseptörü
- GOAT:** Ghrelin O-açıltransferaz
- HAMP:** Hepsidin antimikrobiyal peptit
- Hb:** Hemoglobin
- Hct:** Hematokrit
- HIF2 α :** Hipoksi ile indüklenen faktör 2-alfa
- HJV:** Hemojuvelin
- HRE:** Hipoksi yanıt elemanı
- HRP:** Horseradish Peroksidaz
- Hsp:** Isı şoku proteini

IRE: Demire duyarlı bir element

IRP: Demir düzenleyici proteinler

LCN2: Lipokalin-2

MCV: Ortalama Eritrosit Hacmi

Nitroso-PSAP: 2-Nitrozo-5-[N-n-propil-N-(3-sülfopropil)amino]fenol

NPY: Nöropeptit Y

PC1/3: Prohormon konvertaz 1/3

PHD: Prolil-4-hidroksilaz

Plt: Trombosit

POMC: Pro-opiomelanokortin

PPAR γ : Peroksizom proliferatörle aktive reseptör gama

RBC: Kırmızı kan hücresi

ROS: Reaktif oksijen türleri

SS: Somatostatin

STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü

TDBK: Total demir bağlama kapasitesi

Tf: Transferrin

TLR: Toll benzeri reseptör

TMB: Tetrametil benzidin

TMPRSS6: Transmembran serin proteaz-2

TPTZ: 2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin

TWSG1: Gastrulasyon proteini homolog 1

UIBC: Doymamış demir bağlama kapasitesi

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VHL: von-Hippel-Lindau

WBC: Beyaz Kan Hücresi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri	33
Tablo 2: Hasta ve kontrol gruplarının hemogram parametrelerinin karşılaştırılması	34
Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması	34
Tablo 4: Hasta ve kontrol grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametrelerinin karşılaştırılması	35
Tablo 5: Kontrol grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi.....	37
Tablo 6: Hasta grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi.....	38
Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunda Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametrelerinin Demir, UIBC, TDBK ve Ferritin parametreleriyle korelasyon analizi	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Hemoglobinopatinin endemik olduğu bölgeler.....	5
Şekil 2: İnefektif eritropoez ve transfüzyona bağlı görülen değişiklikler	7
Şekil 3: A, hepsidin/Fab yapısı. B, düzensiz tepe noktaları ve kükürt atomlarının yerleri. Hepsidinin yüksek (C) ve düşük sıcaklıkta (D) nükleer manyetik rezonans (sırasıyla kırmızı ve mavi) ve kristal yapısının (yeşil) örtüşmesi	8
Şekil 4: Hepsidinin BMP-SMAD1/5/8 yolağı üzerinden hücre içi etkileri ve düzenlenmesi.....	10
Şekil 5: HIF proteinlerinin düzenlenmesi.....	13
Şekil 6: Ghrelin sentezi.....	16
Şekil 7: Ghrelinin fizyolojik etkileri.....	20
Şekil 8: Demirin intestinal lümeninden emilimi.....	23
Şekil 9: Demir ölçümünde gerçekleşen reaksiyonların prensibi	30
Şekil 10: Hasta ve kontrol grubunda ghrelin düzeylerinin boxplot grafiği	36
Şekil 11: Hasta ve kontrol grubunda hepsidin düzeylerinin boxplot grafiği	36
Şekil 12: Hasta ve kontrol grubunda HIF-2 düzeylerinin boxplot grafiği.....	37

ÖZET

AMAÇ: Demir metabolizmasının düzenlenmesinde HIF2 α , hepsidin, ferroportin molekülleri önemli bir role sahiptir. Son yıllarda demir eksikliği anemisi olan hastalarda yapılan çalışmalarda ghrelin hormonu ve demir metabolizması arasındaki ilişki incelenmiştir. Beta talasemi major inefektif eritropoez ve sık kan tansfüzyonları nedeniyle yüksek ferritin düzeylerinin görüldüğü konjenital bir hastalıktır. Beta talasemi major hastalarında HIF2 α , hepsidin, ferroportin molekülleri ile ilgili çalışmalar bu yolaklarda bozukluklar olduğunu göstermektedir. Biz bu çalışmamızda ghrelin hormon düzeyinin beta talasemi major hastalarındaki değişimini inceleyerek bu hastalığın etyopatogenezine katkıda bulunmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamıza 75 gönüllü dahil edildi. Çalışmaya katılan gönüllüler 18-45 yaş arasında 42 kadın ve 33 erkekten oluşuyordu. Gönüllülerin 52'si beta talasemi major hastası 23'ü sağlıklı kontrol grubuydu. Çalışmaya dahil edilen hastalar düzenli tedavi altında olan takipli hastalardı. Gönüllülerden alınan kan örneklerinden hemogram parametreleri, rutin biyokimyasal parametreler ve serum ferritin, vitamin B12, folik asit, HIF2 α , hepsidin, ghrelin düzeyleri çalışıldı. Serum HIF2 α , hepsidin, ghrelin düzeyleri elisa yöntemiyle ölçüldü.

BULGULAR: Eritrosit indeksleri (RBC, Hb, Hct, MCV), WBC, Plt seviyeleri; total bilirubin, direkt bilirubin, UIBC, TDBK ve ferritin düzeyleri iki grup arasında anlamlı farklılıklar gösterdi. Serum folik asit, vitamin B12, HIF2 α ve hepsidin düzeyleri kıyaslandığında iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Hasta grubu ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında serum ghrelin düzeyleri hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Hasta grubunda serum ghrelin ve ferritin düzeyleri arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edildi.

SONUÇ: Beta talasemi major hastalarında serum hepsidin ve HIF2 α düzeylerinin kontrol grubuyla aynı düzeyde olması tedavinin etkinliğinin bir göstergesi olabilir. Beta talasemi major hastalarında yüksek ghrelin düzeylerinin bozulmuş demir metabolizmasının regülasyonunda önemli bir role sahip olabileceğini düşündürdü. Serum ghrelin düzeyleri ile ferritin arasındaki pozitif korelasyon serum demirinin ghrelin sentezinde önemli role sahip olabileceğini, artan ghrelin düzeylerinin ferritin

sentezini artıran bir etken olabileceğini düşündürdü. Bu konuda hücreseel düzeyde yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



ABSTRACT

OBJECTIVE: HIF2 α , hepcidin and ferroportin molecules have an important role in the regulation of iron metabolism. In recent years, studies conducted in patients with iron deficiency anemia have investigated the relationship between ghrelin hormone and iron metabolism. Beta thalassemia is a congenital disease in which high ferritin levels are seen due to major ineffective erythropoiesis and frequent blood transfusions. Studies on HIF2 α , hepcidin, and ferroportin molecules in beta thalassemia major patients show that there are disorders in these pathways. In this study, we aimed to contribute to the etiopathogenesis of this disease by examining the changes in ghrelin hormone levels in patients with beta thalassemia major.

MATERIALS AND METHODS: 75 volunteers were included in our study. The volunteers participating in the study consisted of 42 women and 33 men aged 18-45 years. Of the volunteers, 52 were patients with beta thalassemia major and 23 were healthy controls. The patients included in the study were followed-up patients who were under regular treatment. Hemogram parameters, routine biochemical parameters and serum ferritin, vitamin B12, folic acid, HIF2 α , hepcidin, ghrelin levels were studied from blood samples taken from the volunteers. Serum HIF2 α , hepcidin, ghrelin levels were measured by ELISA method.

RESULTS: Erythrocyte indices (RBC, Hb, Hct, MCV), WBC, Plt levels; total bilirubin, direct bilirubin, unsaturated iron binding capacity, total iron binding capacity and ferritin levels showed significant differences between the two groups. When serum folic acid, vitamin B12, HIF2 α and hepcidin levels were compared, no significant difference was found between the two groups. When the patient group and healthy controls were compared, serum ghrelin levels were found to be significantly higher in the patient group. There was a significant positive correlation between serum ghrelin and ferritin levels in the patient group.

CONCLUSION: The fact that serum hepcidin and HIF2 α levels in beta thalassemia major patients are at the same level as the control group may be an index of the effectiveness of the treatment. It suggested that high ghrelin levels may have an important role in the regulation of impaired iron metabolism in patients with beta

thalassemia major. The positive correlation between serum ghrelin levels and ferritin suggested that serum iron may have an important role in ghrelin synthesis, and that increased ghrelin levels may be a factor that increases ferritin synthesis. Further studies are needed on this subject at the cellular level.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beta talasemi konjenital hemoglobinopatiler arasında çok sayıda organın etkilendiği komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. İnefektif eritropoeze bağlı olan kronik anemi, hipoksi, sık kan transfüzyonları, demir şelasyon tedavilerine rağmen yüksek demir seviyeleri bu hastalarda görülen en sık problemlerdir. Bu hastalarda yüksek demir seviyelerinin bozulmuş hepsidin-ferroportin yolağı dışında özellikle ince bağırsaklardan kronik hipoksi nedeni ile artan demir emilime bağlı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (1). Literatürde beta talasemi hastalarında ghrelin hormonunun gonadal gelişim üzerine etkileri incelenmiş ve ghrelin hormon eksikliğine bağlı olarak gonadal gelişim yetersizliği olabileceği vurgulanmıştır (2). Literatürde ghrelinin demir metabolizması üzerine etkileri daha çok demir eksikliği anemisinde araştırılırken (3,4), ghrelin hormonu ile hemoglobinopati hastalarda demir düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır.

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, antiinsülinanjik etki, vazodilatasyon ghrelin hormonunun fizyolojik etkileri olarak belirtilmektedir (5,6).

Literatürde ghrelin hormonu ve demir metabolizması ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada ghrelin peptidinin karaciğer ve dalakta ferroportin-1 molekülünün ekspresyonunu arttırdığı belirtilmektedir (7). Bilindiği üzere ferroportin-1 molekülü vücudun ihtiyacına göre bağırsak, karaciğer gibi dokulardan kana demir molekülünün salınımını sağlayan proteindir. Ferroportin-1 molekülünün seviyelerinin düzenlenmesinde ayrıca hepsidin, hipoksi ile indüklenen faktör 2-alfa (HIF2 α) molekülleri de rol almaktadır. HIF2 α molekülü 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 (8). HIF2 α molekülleri ise özellikle bağırsak hücrelerinde ferroportin molekülünün gen ekspresyonunu arttırarak serum demir düzeylerini arttırmaktadır (9).

Biz bu çalışmamızda beta talasemi major hastalarında serum ghrelin, hepsidin, HIF2 α ve ferritin düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek, ghrelin hormonunun demir metabolizması üzerindeki olası etkilerini araştırdık. Beta talasemi major hastalarında demir metabolizmasının bozulmasına yol açan moleküler yolların etkileşimini göstermeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TALASEMİ

Talasemi, Yunanca thalassa (deniz) ve haima (kan) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. (1). Talasemi, hemoglobin A'nın α veya β globin zincirlerinin sentezi ile ilgili bozuklukları ifade eder. Kromozom 11 (β) ve 16 (α) üzerinde yer alan globin genlerinin bir veya daha fazlasının patolojik allelleri şeklinde aktarılır. 200'den fazla tespit edilen mutasyon, α ya da β globin mRNA'sında transkripsiyon ve/veya translasyon bozukluklarına neden olmaktadır (10,11).

2.1.1. Hemoglobinin Yapısı

Hemoglobin (Hb), her biri bir hem prostetik grubuna bağlı α -benzeri ve β -benzeri globin alt birimlerinden oluşan bir heterotetramerdir (12). Globin zincirlerinin bileşimine göre hemoglobin tipi belirlenir. HbF (Fetal hemoglobin) iki alfa ve iki gama zincirine (2 alfa 2 gamma), HbA iki alfa ve iki beta zincirine (2 alfa 2 beta), HbA2 iki alfa ve iki delta zincirine (2 alfa 2 delta) sahiptir. Yenidoğanda HbF, toplam hemoglobinin yaklaşık yüzde 80'ini, HbA ise yüzde 20'sini oluşturur. Gama globin sentezinden (HbF) beta globin sentezine (HbA) geçiş fetal hayatta başlar. Yaklaşık altı aylık olduklarında, sağlıklı bebekler çoğunlukla normal hemoglobin miktarlarına ulaşır (13). Doğumdan bir yıl sonra yetişkin Hb fenotipi tamamen yerleşir ve HbA ($\alpha_2\beta_2$, %97), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$, %2) ve HbF'den ($\alpha_2\gamma_2$, %1) oluşur (14).

Hemoglobinopatiler dünya çapında en yaygın kalıtsal hastalıklar arasındadır. Dünya çapında nüfusun yaklaşık %1-5'i talasemi mutasyonu taşıyıcısıdır. Talasemiler, hemoglobin üretiminde otozomal resesif olarak kalıtılan hastalıklardır(15).

Hemoglobin bozuklukları, globin zinciri üretimindeki patolojik bozukluklara göre karakterize edilir;

- Kantitatif kusur (Talasemiler: α -talasemi, β -talasemi vb.)
- Kalitatif kusur (Hemoglobinopatiler)
- Fetal Hb'nin kalıtsal kalıcılığı (16)

α -Talasemi genellikle α -globin gen bölgesindeki delesyonlardan veya daha nadiren nokta mutasyonlarından kaynaklanır. β -talasemi ise genellikle β -globin genindeki nokta mutasyonları sonucu meydana gelir (14). β -globin geninin normal fonksiyonunu etkileyen 200'den fazla mutasyon tespit edilebilmiştir (17). Bunlar arasında promotor bölge mutasyonları, poliadenilasyon mutasyonları, konsensus bölgesi nükleotit değişiklikleri, intron değişiklikleri gibi mutasyonlar bulunmaktadır(18).

2.1.2. Beta Talasemiler

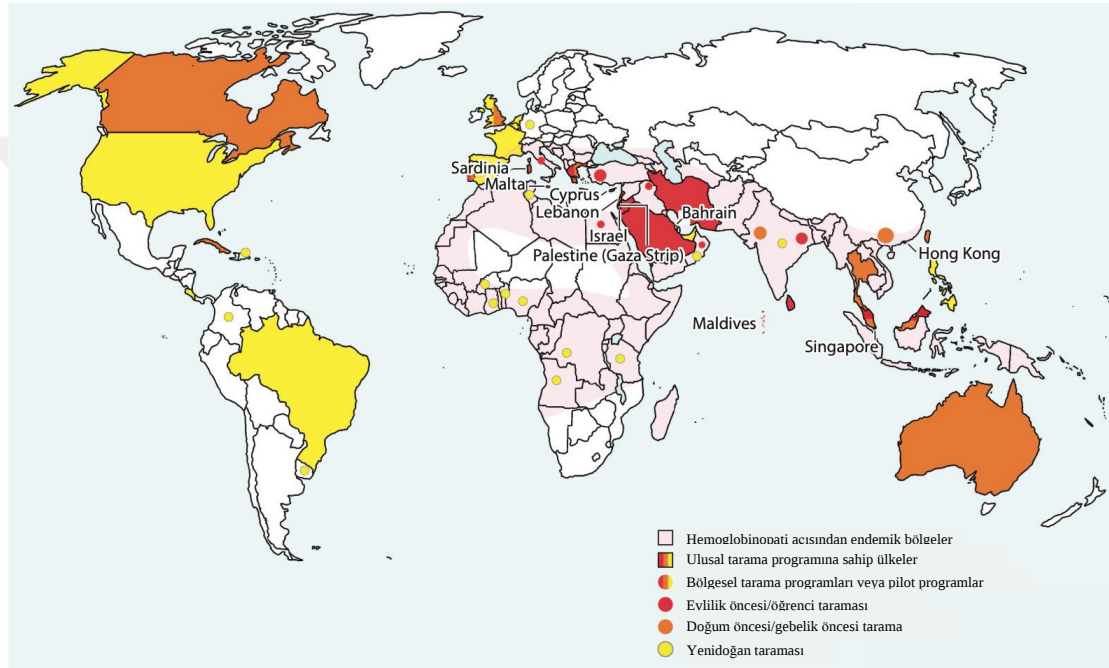
β -talasemiler, β -globin zincir sentezinin azalması veya olmaması ile karakterize heterojen otozomal resesif kalıtsal anemilerdir. β -talasemi oldukça yaygındır ve küresel nüfusun %1,5' inin taşıyıcı olduğu rapor edilmiştir (19). Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan, Uzak Doğu, Afrika'nın kuzey kıyısı boyunca uzanan ülkeler ve Güney Amerika'da sık görülmektedir (1,20). Türkiye'de 1995-2000 yılları arasında 100 000 kişide β -talasemi prevalansı 5.7, β -talasemi taşıyıcı oranı ise % 4.3 bulunmuştur. Kapsamlı bir ulusal hemoglobinopati kontrol programı 24 Ekim 2002'de yürürlüğe girdikten sonra 2008 yılına kadar Türkiye'de etkilenen yenidoğanlarda %90 azalma sağlanmıştır (21). 1 Kasım 2018 tarihinden sonra Hemoglobinopati Kontrol Programı, "Evlilik Öncesi Hemoglobinopati Tarama Programı" şeklinde tüm Türkiye'de uygulanmaya başlanmıştır. Türkiye'de, beta-talasemi taşıyıcı sıklığı %2,1'dir (22). Dünya genelinde hemoglobinopati dağılımı şekil 1'de gösterilmiştir (14).

Üç ana formu içerir;

- 1) β -talasemi majör (TM)(Cooley anemisi / Akdeniz anemisi)
- 2) β -talasemi intermedia (TI)
- 3) β -talasemi minör (β -talasemi taşıyıcısı/ β -talasemi trait /heterozigot β -talasemi)(19)

Bir hatalı beta globin geni varsa beta talasemi minör veya beta talasemi taşıyıcısı, iki gen hatalı ise beta talasemi major hastalığı meydana gelir. Beta globin genindeki mutasyon, beta zincirinin hiç yapılmamasına veya az yapılmasına neden olur. Alfa zincir yapımı normal hızda devam ettiği için alfa zincir lehine dengesizlik

olur. Bu da inefektif eritropoeze yol açar (18). İnektif eritropoez, eritroid progenitörlerin anormal farklılaşması veya olgunlaşması bununla birlikte anormal eritroblastların artan yıkımı ile karakterizedir. İnektif eritropoezde, eritroid progenitörlerinin çoğalması ve hayatta kalması artmasına rağmen, hücrelerin sadece az bir kısmı olgunlaşır ve eritroblastlardan normal koşullar altında beklenenden oransal olarak daha az RBC (kırmızı kan hücresi) üretilir (23).



Şekil 1: Hemoglobinopatinin endemik olduğu bölgeler

2.1.2.1. Beta talasemi hastalığında klinik bulgular:

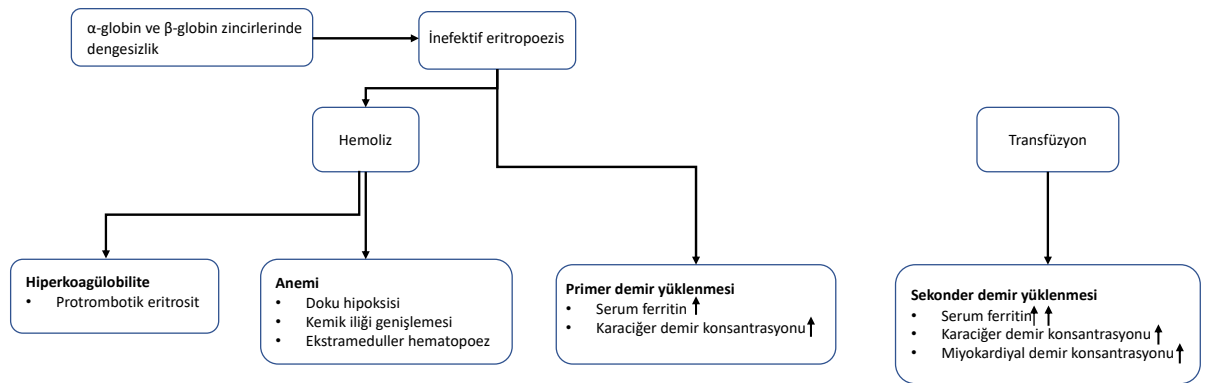
Klinik olarak talasemi kronik anemi, artmış bağırsak demir emilimi ve bunun sonucunda gelişen kronik komplikasyonlar (karaciğer yetmezliği, kalp yetmezliği, diabetes mellitus vb.) ve mortalite ile karakterizedir (24,25).

Talasemi majör klinik olarak doğumdan sonra 6 ile 24 ay arasında semptom verir. Etkilenen bebeklerde gelişme geriliği oluşur ve giderek solgunlaşır. Beslenme sorunları, ishal, sinirlilik, tekrarlayan ateş nöbetleri ve dalak ve karaciğer büyümesi görülebilir. Hastaların tedavi edilmediği veya yetersiz transfüzyon yapıldığı

durumlarda, talasemi majörünün klinik tablosu büyüme geriliği, solgunluk, sarılık, zayıf kas yapısı, genu valgum, hepatosplenomegali, bacak ülserleri, ekstramedüller hematopoez ve kemik iliğinin genişlemesinden kaynaklanan iskelet değişiklikleri şeklinde görülebilir. İskelet sisteminde görülen deformiteler, uzun kemiklerdeki şekil bozukluklarını ve kraniyofasiyal değişiklikleri (kafatası çıkıntısı, belirgin malar eminens, burun kemiği basıklığı, gözün mongoloid eğilimi ve maksilla hipertrofisi) içerir (1).

Talasemi intermedia'lı bireylerde semptomlar, daha geç dönemde bulgu verir. Daha hafif anemiye sahiptir, transfüzyon gerektirmez veya nadiren gerektirir. Klinik olarak erken bulgu veren şiddetli hastalar, 2 ile 6 yaşları arasında semptom verir ve düzenli kan transfüzyonu almamalarına rağmen, büyüme ve gelişme geriliği oluşur. Kronik anemi sonucu ekstramedüller eritropoez ile eritroid iliğin hipertrofisi görülür. Sonuç olarak, kemik ve yüzün karakteristik şekil değişiklikleri, uzun kemik kırıkları ile osteoporoz ve dalak, karaciğer, lenf düğümleri, omurgayı etkileyen eritropoietik kitleler oluşabilir. Talasemi minör taşıyıcıları genellikle asemptomatiktir ancak bazen hafif bir anemi görülebilir (1).

Talasemili hastalarda, eritrosit morfolojik değişiklikleri [mikrositoz, hipokromi, anizositoz, poikilositoz (spiküle gözyaşı damlası ve uzun hücreler)] ve eritroblast görülebilir. Eritroblast sayısı aneminin şiddeti ile ilişkilidir ve özellikle splenektomiden sonra artış gösterir (1). Transfüzyon bağımlı hastalarda demir toksisitesi, gelişimin tüm aşamalarını (eritropoez, büyüme, cinsel olgunlaşma, endokrin homeostazi, kardiyak, karaciğer ve böbrek fonksiyonu, kemik metabolizması, yaşlanma) etkileyebilir ve onları artan bir malign transformasyon riskine maruz bırakır (24).



Şekil 2: İnefektif eritropoez ve transfüzyona bağlı görülen değişiklikler

2.1.2.2. Beta talasemi hastalarında tedavi:

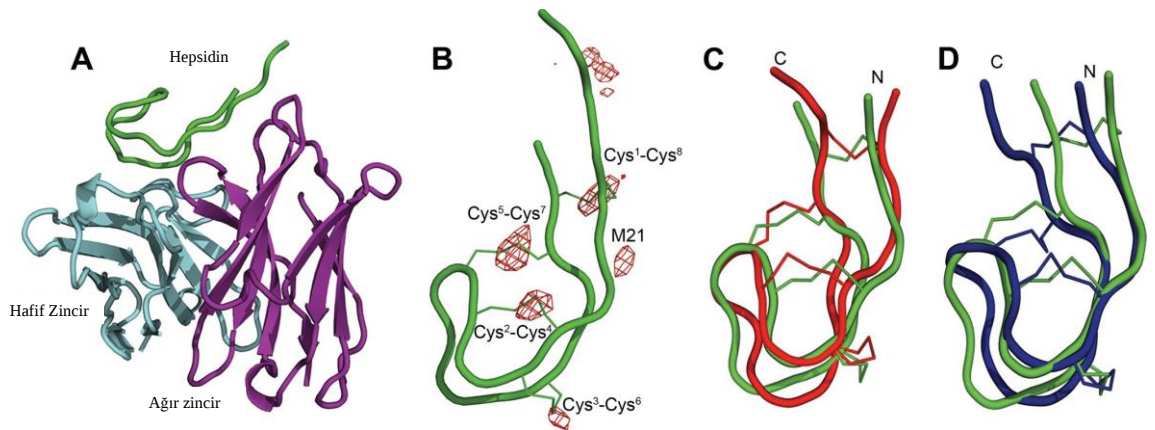
Beta talasemi majör hastaları, hemoglobin seviyesini 9 g/dL ‘den daha yüksek tutmak için periyodik olarak yaşam boyu kan transfüzyonlarına gereksinim duyar. Kan transfüzyonu ihtiyacı altı aylıkken başlayabilir. Beta talasemi intermedia'lı hastalar için, transfüzyon kararı klinik değerlendirme sonucu verilir. Kişinin hemoglobini normal bir yaşam için yetersiz olduğunda veya anemi büyüme ve gelişmeyi bozduğunda gerekli hale gelir (13). İnefektif eritropoez ve transfüzyona bağlı görülen değişiklikler şekil 2’de gösterilmiştir (26).

2.2. HEPSİDİN

Hepatik bakterisidal protein (hepsidin), karaciğerde eksprese edilen antimikrobiyal peptit olarak 2000 yılında insan idrarında keşfedilmiştir (27). Sentez yeri (hep-) ve antibakteriyel özellikleri (-cidin) sebebiyle hepsidin adını almıştır. Hepsidin temel olarak demirin homeostazında görev alan bir hormondur. Sistein açısından zengin, küçük katyonik bir peptittir (28). Hepsidin birincil olarak hepatositlerde ve daha az ölçüde monositler, makrofajlar, adipositler, böbrekler, ince bağırsak, plasenta, retinal hücreler ve kardiyomiyositler tarafından sentezlenir (27).

Hepsidin, hepsidin antimikrobiyal peptit (HAMP) geni tarafından üretilir(27). HAMP geni, 19q13 kromozomunda bulunur. HAMP geni; beyin, karaciğer, omurilik, akciğerler, kalp, iskelet kasları, bağırsak, mide, pankreas, testis, adipositler ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok bölgede ifadeye sahiptir. Hepsidin translasyon sonrası üretimine hepatik prohormon konvertaz furin aracılık eder (28). Başlangıçta 84 amino asitlik pre-pro-hepsidin şeklinde sentezlenir. Daha sonra 60 amino asit olan pro-hepsidine işlenir. Son olarak C-terminali 25 amino asit aktif peptit olarak bölünür. Hepsidin, 4 disülfid bağı ile stabilize edilmiş saç tokası yapısında sıkı katlanmış bir peptit hormondur. HAMP geni mutasyonunda, aşırı demir yüklenmesi ve hemokromatoz görülür. Hepsidin ekspresyonu aşırı demir yüklenmesi ve inflamasyonda artar, demir eksikliği ve hipoksi durumlarında azalır (27).

Hepsidin, demir emilimini ve geri dönüşümünü kontrol etmek için ferroportin içselleştirmesini ve yıkımını indükler. Bağırsaktan demir emilimini düzenler. Demirin, negatif geri bildirim mekanizması ile makrofajlardan kana salımını sağlar. Hepsidin, ferroportini parçalayarak demirin kana geçişini engeller. Hepsidin demir homeostazını 3 farklı yolla yapar: duodenumda besinlerden demir emilimini azaltma, dolaşımdaki makrofajlardan demir salınımını blokajlama ve hepatositler içindeki demir stoklarının taşınmasını kontrol etme. Plazma demir konsantrasyonu arttığında, hepatik dokularda hepsidin mRNA transkripsiyonu artar(29).



Şekil 3: A, hepsidin/Fab yapısı. B, düzensiz tepe noktaları ve kükürt atomlarının yerleri. Hepsidin yüksek (C) ve düşük sıcaklıkta (D) nükleer manyetik rezonans (sırasıyla kırmızı ve mavi) ve kristal yapısının (yeşil) örtüşmesi (30).

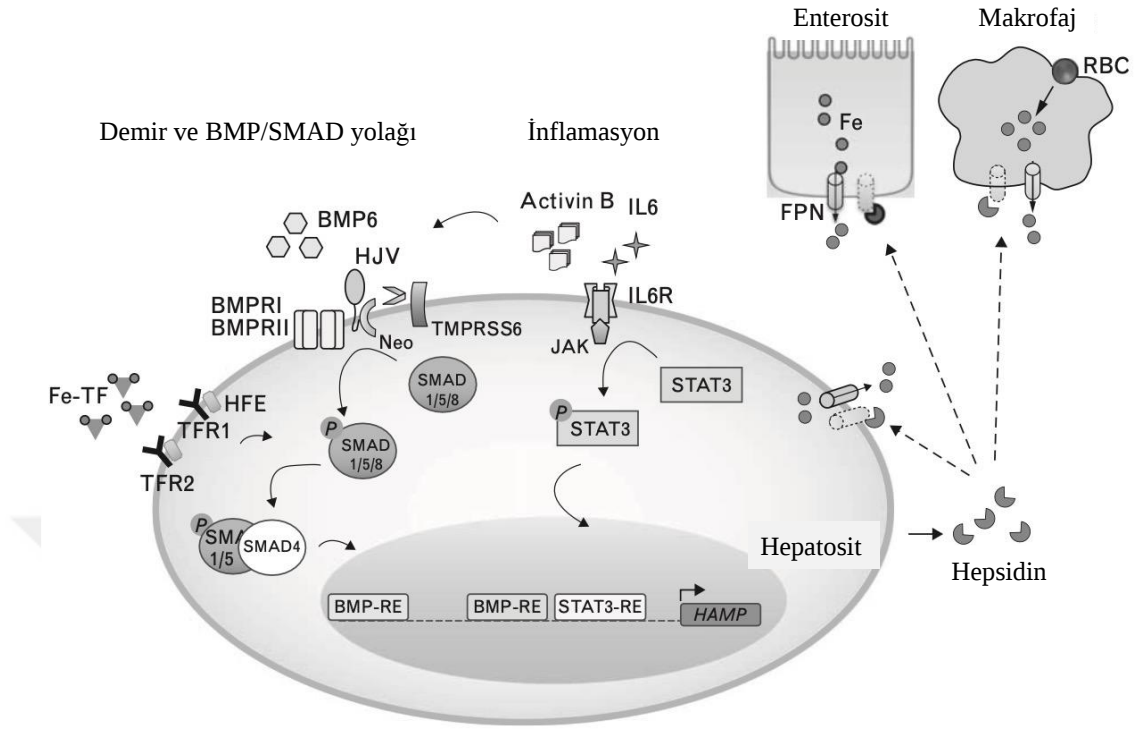
2.2.1. Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Kemik morfojenik proteini (BMP) ve koreseptörü hemojuvelin (HJV) tarafından karaciğerde hepsidin transkripsiyonu düzenlenir. BMP'ler, özellikle BMP-6, HAMP ekspresyonunu indükleyebilir ve sonucunda hepatosit hepsidin ekspresyonunu arttırabilir (27).

BMP6-SMAD1/5/8 yolu, moleküler düzeyde demire yanıt olarak hepsidinin transkripsiyonel düzenleyicisi olarak görev yapar. BMP6, koreseptör HJV ve BMP tip I ve tip II reseptörlerine bağlanır. İletilen sinyalle SMAD1/5/8 proteinlerinin fosforilasyonu indüklenir. Fosforillenmiş SMAD1/5/8 proteinleri, SMAD4 ile kompleks oluşturur ve hepsidin promotörü üzerindeki BMP'ye yanıt veren elementler bölgesine bağlanır. Hepsidin transkripsiyonu indüklenir (8).

Karaciğer demirindeki artışlar, ağırlıklı olarak karaciğerde parankimal olmayan hücrelerde BMP6 ekspresyonunu indükler. Dolaşımdaki transferrinle taşınan demir ise, transferrin reseptörü 1 ve 2 tarafından algılanır ve BMP6'dan bağımsız olarak SMAD1/5/8 fosforilasyonunu indükler. Bu şekilde BMP-SMAD1/5/8 sinyal yolağı uyarılır(8).

BMP6 sinyali, HJV tarafından modüle edilir. HJV ise TMPRSS6 (transmembran serin proteaz-2) geni tarafından kodlanan matriptaz-2 tarafından yıkılır. TMPRSS6, demir eksikliğine yanıt olarak bu yolun negatif düzenleyicisidir. BMP'ler ayrıca SMAD'den bağımsız yollar örneğin mitojenle aktive olan protein (MAP) kinazlar aracılığıyla da sinyal verebilir (27).



Şekil 4: Hepsidin BMP-SMAD1/5/8 yolağı üzerinden hücre içi etkileri ve düzenlenmesi (8).

2.2.2. Hepsidin Sentezini Etkileyen Faktörler

Hepsidin pozitif regülasyonu:

- Vücut demir yükü
- İnflamasyon (Özellikle IL-6 Janus kinaz sinyal yolağı aracılığıyla etkir.)

Hepsidin negatif regülasyonu:

- EGF (Epidermal büyüme faktörü)
- Testosteron
- Östrojen
- Hipoksi
- Eritropoezis (28,31)

2.3. HIF2 ALFA

Oksijen homeostazının düzenlenmesi ve korunmasının, hücre canlılığının devamında önemli bir rolü vardır. Hipoksi, bir dokuda düşük veya yetersiz oksijen bulunma durumunu ifade eder. Fizyolojik ve patolojik durumlarda görülebilir. Hücreler, belirli organlara yetersiz kan akışı veya düşük hemoglobin seviyeleri nedeniyle protein aktivitesini modüle ederek veya hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde, kimyasal bileşiklere maruz kalmanın neden olduğu oksijen yoksunluğuna uyum sağlayabilir (32).

Hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF'ler) başlangıçta hipoksi tarafından indüklenen eritropoietin (EPO) gen düzenleyici sekansa bağlanan bir protein kompleksi olarak keşfedilmiştir. Bunlar, hipoksiye verilen genomik yanıtın ana transkripsiyon faktörleri ve anahtar düzenleyicileridir. HIF'ler, yaygın olarak eksprese edilen ve ekspresyonu oksijen tarafından düzenlenen yüksek oranda korunmuş heterodimer transkripsiyon faktörleridir (33).

Hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin aktivasyonu , eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve farklılaşması , metabolizma gibi bir çok biyolojik süreçte yer alan yüzlerce genin ekspresyonunu düzenler ve düşük oksijen durumlarına adaptasyonu kolaylaştırır (34). HIF sinyali ayrıca transkripsiyonel baskılayıcılar ve mikroRNA'lar gibi HIF hedef genleri aracılığıyla gen ekspresyonunu da baskılayabilir. HIF sinyali, hipoksiye cevabın regülasyonunda Notch ve nükleer faktör- κ B (NF κ B) gibi sinyal yollarıyla da etkileşim halindedir (35). İskemik kardiyovasküler hastalık, felç, kronik akciğer hastalığı ve kanser gibi birçok hastalıkta HIF'i hedef alan genlerin ekspresyonunda artış gözlenmiştir (34).

Helix-loop-helix Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) ailesinin temel üyeleri olan heterodimerik HIF transkripsiyon faktörleri, oksijene duyarlı bir α alt birimi ve fonksiyonel bir HIF oluşturan aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator (ARNT) olarak da bilinen kararlı, yapısal olarak ifade edilen bir β alt birimi içerir (33).

Hipoksi ile indüklenebilir faktör α 'nın üç alt tipi bulunur. Bunlar; HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α 'dır. HIF-1 α 'nın ekspresyonu yaygındır ve transferrin (Tf), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), glukoz taşıyıcıları, glikolitik yol enzimleri, insülin benzeri büyüme faktörü-2, endotelin-1 ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz kodlayan genler gibi çok sayıda geni transkripsiyonel olarak upregüle eder. Bununla birlikte, HIF-2 α ve HIF-3 α çoğunlukla dokuya özgü eksprese edilir. HIF-2 α 'nın ekspresyonu renal interstisyel fibroblast benzeri hücreler, endotelial hücreler ve glialar gibi spesifik hücre tiplerindedir. Enterosit demir alımında önemli bir rol oynar ve EPO üretiminin birincil düzenleyicisidir (33). HIF-1, hipoksi başladıktan sonra hemen uyarılırken, HIF-2 daha yavaş aktive edilir ve aktivasyon daha uzun süre devam eder. HIF-1 ve HIF-2, ortak bir hipoksi yanıt elemanı (HRE) aracılığıyla hareket eder ancak hücre tipine bağlı olarak farklı hedef genlerin aktivasyonuna neden olabilir (35). HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın glukoz metabolizmasını, anjiyogenezi, hücre sağ kalımı, proliferasyonu, göçü düzenlediği ve HIF sinyal yolunun ayrıca inflamatuvar yanıtlarda ve bağışıklık ortamının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir (33).

HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın %48 amino asiti özdeşdir. HIF-1 α akut hipoksi cevabında aktive olurken, HIF-2 α kronik hipoksi ile alakalıdır (34). Bununla birlikte, HIF α 'nın bir alt biriminde azalma, diğer alt birimde telafi edici bir artışla sonuçlanır. Bir çalışmada HIF-1 α 'nın yıkılmasının karşılıklı düzenleyici mekanizma ile HIF-2 α ekspresyonunu arttırdığı ve bunun HIF-1 α 'dan geçiş yaptığı gösterilmiştir (33).

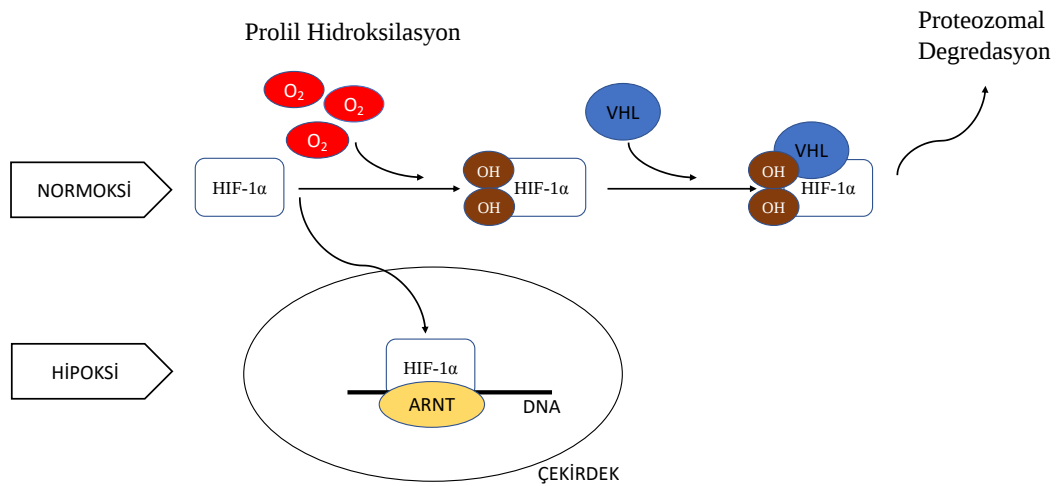
Hipoksi ile indüklenebilir faktör 3, HIF ailesinin en yeni üyesidir. HIF-3 α 'nın farklı promotörler, transkripsiyon başlatma bölgeleri ve alternatif ekleme gibi nedenlerle çoklu varyantlara sahip olduğunu gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada, HIF-3 α varyantlarından bazılarının HIF-1/2 α 'nın baskın-negatif düzenleyicileri olduğu, bazılarının ise ortak β -alt birimleri için yarışarak HIF-1/2 α işlevlerini inhibe ettiği bulunmuştur (33).

2.3.1. HIF Sentezinin Düzenlenmesi

Hidroksilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar ile HIF α alt biriminin stabilitesi ve aktivitesi düzenlenir. HIF regülasyonu, HIF' lerin stabilitesinden ve tam

transkripsiyonel aktivitesinden sorumlu olan prolil-4-hidroksilazların (PHD'ler) aktivitesine ve HIF- α 'yı inhibe eden faktörlere (FIH'ler) bağlıdır (32).

Memeli hücreleri PHD1, PHD2 ve PHD3 içerir. PHD'ler aktif bir bölgede demir bağlanmasını ve koaktivatör substrat olarak oksijeni gerektiren 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenazlardır. Normoksik koşullar altında, PHD'ler, HIF α alt birimlerini ubiquitin-proteazom yoluyla belirli prolinlerde (HIF1 α üzerinde Pro564, HIF2 α üzerinde Pro530 ve HIF3 α üzerinde Pro490) hidroksile eder. HIF'nin VHL'ye (von-Hippel-Lindau) ve ardından E3 ubiquitin ligaz kompleksine bağlanması için oksijene bağımlı prolil-hidroksilasyon gereklidir, bu da HIF- α alt biriminin hızlı proteasomal bozulmasına yol açar. Yani HIF- α normoksik koşullar altında VHL tümör baskılayıcı protein ile etkileşimiyle ubiquitin-proteazom yoluyla parçalanır (33).



Şekil 5: HIF proteinlerinin düzenlenmesi (36).

HIF'yi (FIH) inhibe eden faktör, C-terminal transaktivasyon alanındaki asparagin (Asn) kalıntısını (HIF-1 α : Asn803, HIF-2 α : Asn851) hidroksilatlar, bu da HIF- α ve onun koaktivatör proteini p300/cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB) bağlanmasının inhibisyonuna ve transaktivasyonun baskılanmasına yol açar(34).

Hücrel oksijen veya demir mevcudiyetindeki bir azalma, HIF- α alt birimlerinin PHD'ye bağı prolin hidroksilasyonunu inhibe ederek stabilizasyona yol açar. Stabilizasyonun ardından regülatör subunit birikir ve çekirdeğe yer değiştirir. ARNT/HIF- β ile ortak olur, p300/CBP gibi transkripsiyonel kofaktörleri alır. Hedef gen düzenleyici dizilerin HRE'lerine bağlanır ve genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için bir dizi hedef genin güçlü indüksiyonuna aracılık eder (33). Bu etkileşim, EPO ve VEGF gibi birçok genin uyarılmasını sağlar. Bunun sonucunda doku homeostazını yeniden sağlamak için NF- κ B ve Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) tarafından aracılık edilenler gibi birkaç hipoksik adaptif yolun aktivasyonu gerçekleşir (32).

Hücre dışı ısı şoku proteini 90 (Hsp90), Hsp70 ve Hsp70-etkileşimli proteinin karboksil terminali, HIF-1 α 'nın yaygınlaşmasını ve bozulmasını seçici olarak düzenler. Ancak HIF-2 α 'yı düzenlemez. Ek olarak fosforilasyon, HIF- α stabilizasyonuna neden olan diğer bir yoldur. ERK-MAPK HIF-1 α fosforilasyonu, HIF-1 α aktivasyonuna yol açar. Ayrıca P42/44 ve p38 kinaz da HIF-1 α ve HIF-2 α 'ı fosforile eder (33).

Yapılan son çalışmalarda, PI3K/Protein kinaz B (Akt) ve protein kinaz A (PKA) yolunun da HIF düzenlemesinde rolü olduğu bulunmuştur. PKA yolundaki düzenlemede HIF1 α 'nın fosforilasyonu, proteazomal degradasyonunu inhibe eder ve stabilizasyonuna direk etkisi vardır (32).

2.3.2. HIF Sentezini Etkileyen Faktörler

HIF Proteini Pozitif Regülasyonu

- EPO
- IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler
- Süksinat gibi ara metabolitler, bakteriyel lipopolisakkaritler
- Reaktif oksijen türleri (ROS)

Prolil hidroksilazların düzenlenmesinde oksijen mevcudiyetinin yanı sıra çeşitli metabolitlerin de katkısı vardır. İnflamasyon doğrudan HIF düzenlemesi ile yakından bağlantılıdır. Makrofajlarda, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), NF- κ B'yi

aktive eder, hücre içi ferritini artırarak doğrudan HIF-1 α mRNA'yı ve HIF-1 α ekspresyonunu artırır. IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler ise özellikle HIF-2 α ekspresyonunda artışa neden olur. Ayrıca, sitokin kaynaklı ROS ve özel olarak mitokondriyal ROS 'un HIF 'i doğrudan aktive ettiği gösterilmiştir (33).

Prolil hidroksilazların inhibisyonu, HIF hedef genlerini aktive eder ve PHD'lerin genetik olarak bozulması, HIF ekspresyonunu artırır(33).

2.4. GHRELİN

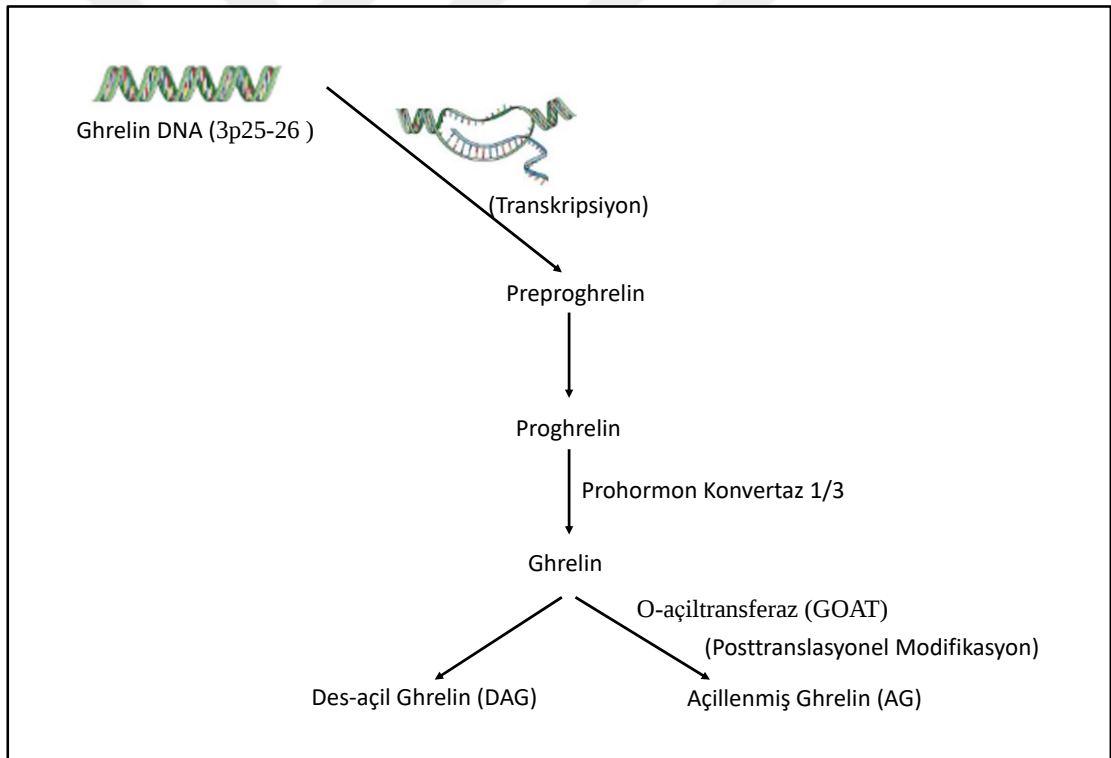
Ghrelın, büyüme hormonu sekretagog reseptörünün (GHSR) endojen ligandı olarak ilk olarak 1999 yılında tanımlanan bir gastrointestinal (GI) hormondur (37). Güçlü büyüme hormonu (GH) salma aktivitesi sergilediğı için adını "büyümek" anlamına gelen "ghre"den almıştır (38).

Ghrelın, gıda alımını ve vücut ağırlığını arttırdığı için “açlık hormonu” olarak adlandırılmıştır. Ghrelinin glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi, gastrik asit sekresyonunun, mide motilitesinin ve boşalmasının uyarılması dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik işlevi gösterilmiştir. Böylece, ghrelinin “açlık hormonu” olarak adlandırılması, pleiotropik bir hormon olarak tanınmasına dönüşmüştür (37).

2.4.1. Ghrelın Sentezi

Ghrelın, 28 amino asitli bir peptit hormonudur ve temel olarak midenin submukozal tabakasındaki P/D1 (insan) ve X/A benzeri (kemirgen) hücreleri tarafından üretilir (37). Midenin yanı sıra plasenta, böbrek, kalp ve tiroide de sentezlendiğı gösterilmiştir (38). İnsan ghrelın geni, GHRL, kromozom 3p25-26 lokusunda bulunur. İlk olarak aktivasyonu için bir dizi işlem adımından geçen 117 amino asitlik preproghrelın olarak sentezlenir. Daha sonra post-transkripsiyonel olarak modifiye edilir (39). Preproghrelın önce proghrelın üretmek üzere parçalanır. Ardından enzim prohormon konvertaz 1/3 (PC1/3) tarafından proghrelın C-terminal Pro-Arg bölgesinde bölünerek ghrelın peptidini üretir (37). Memeli ghrelınlarının amino asit dizileri iyi korunur ve N-terminal 10 amino asitleri aynıdır (39).

Ghrelin, aktivasyonuna göre açillenmiş ghrelin (AG) ve des-açil ghrelin (DAG) olmak üzere iki formu vardır. Bu aktivasyon, O-açiltransferaz (GOAT) tarafından yağ asitlerinden bir açil grubununun ghrelinin serin-3 kalıntısına aktarılmasıyla bir esterleşme reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu oluşur (38). GOAT, açilasyon işlemi için ana açil donörü olarak genellikle oktanoik asiti kullanır bununla birlikte aktivasyon için çeşitli yağ asitlerini (C2 ila C16) de kullanabilir. Ek olarak, orta zincirli yağ asitlerinin artan alımı AG seviyelerini arttırabilir. Oransal olarak dolaşımdaki toplam ghrelinin %10'dan azı açillenirken, %90'ı des-açil ghrelin (DAG) olarak bulunur. DAG'ın biyolojik etkileri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur ancak DAG'nin, muhtemelen GHSR1a'dan bağımsız yollarla ve henüz tanımlanamayan reseptörünün aktivasyonu yoluyla AG etkilerini çoğunlukla engellediğini gösteren artan kanıtlar vardır (37). Ghrelin sentez yolları şekil 6'da gösterilmiştir (40).



Şekil 6: Ghrelin sentezi

2.4.2. Ghrelin Sentezinin Düzenlenmesi

Ghrelin beyinde oreksijenik nöral devrelerin aktivasyonu yoluyla besin alımını, vücut ağırlığını, yağlanmayı ve glikoz metabolizmasını düzenler, sistemik metabolizmayı modüle eder. Merkezi ve periferik dokularda birçok sayı görevi bulunmaktadır (7).

Ghrelin biyosentezi ve salgılanması, açlıkla artış gösterirken beslenmeden sonra azalır. Ghrelin salgılanması, insanlarda alışılmış yeme alışkanlıklarına bağlıdır. Dolaşımdaki ghrelin düzeyi ile vücut kitle indeksi arasında negatif ilişki vardır: Plazma ghrelin konsantrasyonları obezitede daha düşük iken zayıflamada daha yüksektir. Yemek sonrası ghrelin baskılanması, alınan kalori yükü ile orantılıdır ve öğünün makro besin bileşimine bağlıdır. Yüksek D-glukoz veya uzun zincirli yağ asiti bulunan çözeltilere maruz kalmanın, izole mide mukoza hücrelerinde ghrelin salınımını azalttığı gösterilmiştir. İnsülin ise PI3K-Akt yolu mekanizmasıyla ghrelin salgılanmasını azaltır (39).

Ghrelin, periferik besin mevcudiyetini algılar ve beyne iletir. Enerji homeostazının önemli bir düzenleyicisidir ve açlık durumunda organizmayı hipoglisemiden kurtarır. Homeostatik ve hedonik beslenme, metabolik olarak kritik organları (örneğin yağ dokusu, karaciğer ve iskelet kası) metabolik strese (örneğin hipoksi, reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondriyal fonksiyonun bozulması, endoplazmik retikulum stresi) ve metaflamasyondan korur. Metaflamasyon enerji fazlalığı ve gıdalara bağlı gelişen düşük düzeyli ve sürekli savunma cevabıdır. Ghrelinin GH sekresyonunu teşvik etme, anabolik aktiviteyi uyarma, inflamasyonun etkilerini baskılama ve otonom sinir sistemini düzenleme etkileri nedeniyle çeşitli patofizyolojik durumların tedavisi için terapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyeli bulunur (39).

Ghrelin sekresyonu sempatik sinir sistemi tarafından kolaylıkla arttırılır. β 1-adrenerjik reseptör (β 1-AR), farelerin gastrik ghrelin hücrelerinde oldukça zengin bulunmuştur. Buna göre, adrenalin, noradrenalin ve β 1-AR agonisti farelerin mide mukozal hücrelerinden ve ghrelinoma PG-1 hücrelerinden AG ve DAG salgılanmasını güçlü bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (37). Adrenerjik antagonistler ise ghrelin

sekresyonunu baskılar. Buna paralel olarak, ghrelin üreten hücreye özgü $\beta 1$ -adrenerjik reseptör delesyonu, ghrelin sekresyonunu azaltır. Diğer yandan ghrelin salgılanması kemosenör sinyal yolu tarafından da düzenlenir. Acı tat reseptörü agonistleri, ghrelin salgılanmasını artırır (39).

Ayrıca bir çalışmada ghrelinin enerji homeostazının hipotalamik düzenlenmesinde de rol oynadığı bulunmuştur. Ghrelinin, yaşamın erken döneminde hipotalamik nöral yolların normal gelişimi için önemi büyüktür (38).

2.4.3. Ghrelinin Fizyolojik Etkileri

Mide boşalmasının ve motilitesinin uyarılması, uyku ve uyanıklığın düzenlenmesi, tat duyusunun artması, glikoz ve yağ metabolizmasının düzenlenmesi, kas atrofisine karşı koruma ve gelişmiş kardiyovasküler fonksiyon ghrelinin işlevleri arasındadır (38).

Ghrelinin, gıdaların oluşturduğu iştah açıcı yanıtı modüle ettiği gösterilmiştir. Kişide yemeğe karşı oluşan dikkat, zevk beklentisi, yeme motivasyonu ve gıda hafızası gibi faktörler beyinde amigdala, insula, orbitofrontal korteks, görsel alanlar ve striatumda kodlanır. Ghrelinin iştah açıcı etkisi bu bölgeleri uyarmasıyla açıklanabilir. Ghrelin oreksijenik etkisi gösterilen tek GI hormondur. Salgılanan ghrelin beyinde arkuat çekirdeği uyararak oreksijenik peptitleri [nöropeptit Y (NPY) ve aguti ile ilişkili peptit (AgRP)] salgılayan nöronları uyarır. Bu da paraventriküler çekirdeğe sinyal verir ve gıda alımını uyarır. Bununla birlikte ghrelin, anoreksijenik peptit (pro-opiomelanokortin) eksprese eden nöronların NPY/AgRP nöronlarından gama-aminobütirik asit (GABA) uyarısıyla dolaylı olarak baskılanmasına neden olur. Ek olarak ghrelin, ödül temelli yeme davranışı ile ilişkili ventral tegmental alanın dopaminerjik nöronları dahil olmak üzere merkezi nöronal yollarla da gıda alımını indükler. Ghrelin periferik yollarla da enerji alımını uyarır. Örneğin, ghrelinin gerilime duyarlı gastrik vagal afferent sonlanmaların mekanosensitivitesini azalttığı gösterilmiştir. Sonuçta, ghrelin gıda alımını arttırmak için mide doluluk algısını azalttığı düşünülebilir (37).

Üstelik ghrelin, oreksijenik etkisinden bağımsız olarak peroksizom proliferatörle aktive reseptör gamayı (PPAR γ) aktive ederek karaciğerde lipogenezi uyarır ve mekanizma aynı zamanda mTOR-PPAR γ sinyal yolunda da yer alır (38).

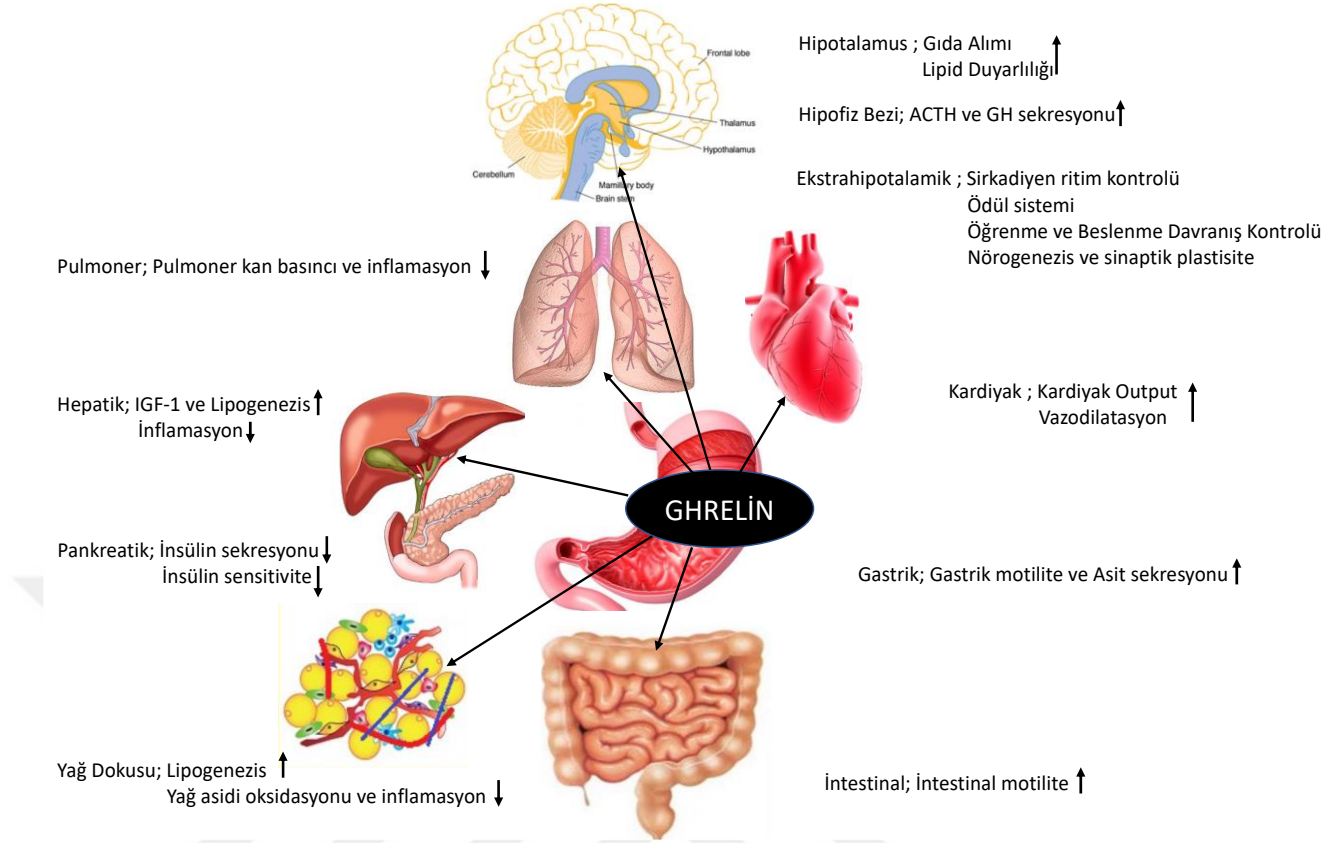
Ghrelinin, glisemiye doğrudan arttırdığı, pankreas insülin salgısını ve plazma insülin seviyelerini azalttığı ve insanlarda insülin duyarlılığını azaltarak glukoz homeostazını etkilediği gösterilmiştir (37).

GI hormonlar, insülin, adipokin ve leptin gibi birçok hormonal sinyalin gastrik ghrelin sekresyonunda etkisi vardır. GI hormonları ile ilgili olarak, somatostatin (SS), GI salgıları üzerinde inhibitör etkileri olan bir hormondur. SS, pankreas, ince bağırsak ve mide antrum dahil olmak üzere çeşitli vücut organlarında bulunur. Dolaşımdaki toplam ghrelin seviyeleri, SS tarafından azaltılır. Bu inhibitör etkinin, ghrelin hücrelerinde eksprese edilen SS reseptörleri (SSTR1, SSTR2 ve SSTR3) üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (37).

Gıda alımından sonra dolaşımdaki ghrelin seviyeleri azalır. Tokluk dolaşımdaki ghrelin düzeylerinin, gastrik besin algılama mekanizmaları, ince bağırsak faktörleri ve hormonal sinyaller dahil olmak üzere çoklu periferik sinyaller tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (37).

Yenidoğan farelerde yapılan bir çalışmada ghrelinin etkisinin inhibisyonu sonucunda, artmış hipokampal nöronal projeksiyonlar ve daha yüksek vücut ağırlığı, visceral yağ birikiminde artış, kan glukoz seviyeleri ve gıda alımında artış ve azalmış leptin duyarlılığı ile ilerleyen, yaşam boyu metabolik disfonksiyon meydana geldiği izlenmiştir. Bu nedenle ghrelinin hipotalamik yollarda ve metabolik regülasyonda çok önemli etkileri olduğu düşünülmektedir (38).

Bununla birlikte, ghrelinin insanlarda JNK1/2 ve p38 sinyalleşmesini inhibe ederek yüksek glukoz/yüksek lipid varlığında endotelial apoptozu baskıladığı gösterilmiştir. Bu da ghrelinin antiinflamatuvar bir etkisi olabileceğini akla getirmektedir (38).



Şekil 7: Ghrelinin fizyolojik etkileri

2.4.4. Ghrelin ve Demir Metabolizması Arasındaki İlişki

Bir çalışmada demir eksikliği anemisi olan çocukların plazmasındaki ghrelin seviyeleri ile demir ve hepsidin seviyeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu durum ghrelinin demir metabolizmasını etkileyebileceğini akla getirmiştir (7). Ghrelin açlık sırasında iştahı artırır ve gıda alımını uyarır. Demir eksikliği anemisinde ise iştahsızlık sık rastlanan klinik bulgulardan bir tanesidir ve bu durum ghrelin azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Demir eksikliği anemisi (DEA) bir açlık durumudur. Diğer bir çalışmada DEA'nın üç farklı evresinde de (hipoferritinemi/demir eksikliği/Demir eksikliği anemisi) hem ghrelin hem de plazma demir içeriğinin azaldığı, demir eksikliği anemisi evresinde olan çocuklarda ise en düşük seviyelere ulaştığı gösterilmiştir. Ayrıca plazmada bu iki parametre arasında anlamlı bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir (41). Başka bir çalışmada DEA'lı prepubertal çocuklarda hem ghrelin hem de demir düzeylerinin kontrollere göre

önemli derecede düşük olduğu saptanmıştır (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, bu da demir tedavisinin serum hepsidin ve ghrelin sentezinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (43).

2.5. DEMİR METABOLİZMASI

Demir, neredeyse tüm canlı organizmalar için gerekli bir eser elementtir. Hücresel ve hücre dışı ortamlarda elektron verme veya kabul etme yeteneği nedeniyle birçok enzimin katalitik bileşenidir (44). Demir, oksijen taşınması için gereklidir ve kollajen, miyelin, nörotransmitterlerin ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin birçok bileşeninin biyosentezinde yer alır (45). Yetişkin sağlıklı bir insan yaklaşık 3-4 g demir içerir (44). Bu demir en yüksek oranda oksijen taşınmasında görevli olan hemoglobinde (yaklaşık %60) ve kas miyoglobininde (%10) bulunur. Kalan kısmı hepatositlerde ve retiküloendotelial makrofajlarda depolanır. Fizyolojik olarak ter, kan kaybı, bağırsak epitel hücrelerinin dökülmesi ve deskuamasyon ile her gün yaklaşık 1-2 mg demir kaybı vardır (46,47). Ancak insanlarda fazla demiri serbest bırakacak fizyolojik aktif atılım mekanizması yoktur ve demir atılımı fizyolojik olarak bu değerlerin üzerine çıkarılamaz (48).

Kemik iliğinde, eritroid hücrelerdeki demirin çoğu hemoglobine dahil edilmiş olsa da, aynı zamanda kırmızı hücre öncüllerinin yüksek çoğalma hızını sürdüren proteinler ve mitokondriyal demir-kükürt kümesi sentezi için kullanılır (49).

Hemoglobin sentezi ve diğer metabolik süreçlerdeki önemli rolünden dolayı, demir sistem içinde geri dönüştürülerek sıkı bir şekilde düzenlenir. Dolaşımdaki peptid hormonu hepsidin, reseptörü ferroportin ile birlikte öncelikle sistemik demir homeostazını korurken, demir düzenleyici proteinler hücre içi demir homeostazının kontrolünde birincil rol oynar (46).

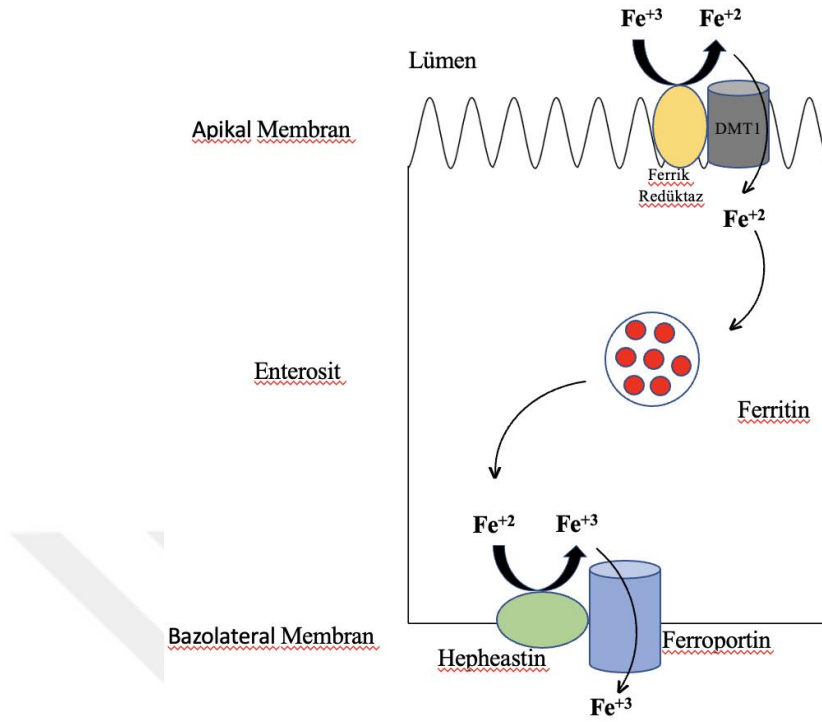
Fazla demir, esas olarak karaciğerde ferritin [FTH(ferritin ağır zinciri) ve FTL(ferritin hafif zinciri)] yoluyla depolanır. Ferritin, apoferritini oluşturan sırasıyla FTL ve FTH genleri tarafından kodlanan L ve H alt birimlerinden oluşur. L ve H alt birimlerinin ekspresyonu, hücrelerin doku tipine ve fizyolojik durumuna bağlı olarak

değişir. Örneğin, dalak ve karaciğerde L alt birimi baskınken, kalpte H alt birimi baskındır (50). H-ferritin alt birimi, bir dinükleer demir bağlama bölgesi içerir ve bu sayede ferroksidaz aktivitesine sahiptir. L-ferritin alt biriminde ise bu bölge bulunmaz. Bu nedenle, L-ferritin alt biriminin birincil işlevinin, ferritin multimer çekirdeği içinde demir depolama ve mineralizasyon olduğu düşünülmektedir (51).

2.5.1. Demir GİS Emilimi

Diyetle alınan demir ferrik demirdir (Fe^{+3}). Enterosit yüzeyindeki ferrik redüktazlarla indirgenerek ferröz demir (Fe^{+2}) haline dönüşür ve divalan metal transporter (DMT1) ile enterosit içine taşınır. Demir ayrıca siderofor ilişkili lipokalin-2'ye (LCN2) bağlanma ve endositoz ile hücreye alınabilir. Hem demiri ise, hücreye tirozin benzeri bir protein taşıyıcıya bağlanarak veya endositoz ile alınır. Plazmaya aktarılmak istenen demir enterosit bazolateral membranı boyunca ferroksidaz aktivitesi bulunan hephaestin tarafından yükseltgenir. Yükseltgenen Fe^{+3} bilinen tek eksporter olan ferroportin ile dolaşıma aktarılır. Ferrik demir, transferrine (TF) yüklenebilir ve daha sonra vücudun ihtiyaçları için kullanılabilir. Yüksek demir seviyeleri, sistemik demir metabolizmasının en önemli düzenleyicisi olan hepsidinin karaciğer tarafından sistemik salgılanmasına yol açar (48,52). Hepsidin, demir emilimini ve geri dönüşümünü kontrol etmek için ferroportin içselleştirmesini ve yıkımını indükler (44).

SLC11A2 geni enterositlerde DMT1'i eksprese eder. DMT1 ekspresyonu; demir azaldığı durumlar, hipoksi ve demir emilimini uyaran diğer nedenler tarafından kuvvetli bir şekilde uyarılır. Ters durumda, vücut demir depoları yüksek olduğunda ve enfeksiyona yanıt olarak DMT1 ekspresyonu azalır. DMT1'in mRNA transkripti duodenumda yüksek oranda eksprese edilir ve demire duyarlı element (IRE) içerir. IRE, demir düzenleyici proteinler (IRP) aracılığıyla DMT1'in demire bağlı düzenlenmesini sağlar. Demir tükenmesi durumunda, IRP 'ler IRE 'ye bağlanır ve DMT1 proteininin sentezini artırır. Tersine demir talebi azaldığında; IRP'ler, DMT1 mRNA transkripti ve IRE ile etkileşime girmez ve DMT1 destabilize olur. Böylece DMT1 ekspresyonu ve bağırsaktan demir taşınması azalır. Ayrıca hipoksi durumunda stabilize olan HIF2 α , SLC11A2 genini aktive ederek demir emilimini uyarır (53). İntestinal lümeninden demir emilimi şekil 8'de gösterilmiştir (54).



Şekil 8: Demirin intestinal lümandan emilimi

Demir ve eritropoez birçok seviyede birbirine bağlıdır, karşılıklı olarak düzenlenir. İlk olarak, demir eritroid hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için gerekli olan büyüme faktörü olan eritropoetin renale üretilir (55). HIF, düşük oksijene hücre adaptasyonel yanıtın temel düzenleyicisidir. Anemi gibi durumlarda HIF-2 α eritropoetin sentezine aracılık eder. Sistemik oksijen ve demir mevcudiyetine göre IRP1/HIF-2 α eksenini duodenal demir emilimi koordine edilir (49).

2.5.2. Demirin GİS Emilimini Etkileyen Faktörler

Diyetsel (örneğin askorbik asit alımı) ve endojen (örneğin mide asidi ve sitrat) nedenler, DMT1'in substratı olan daha çözünür Fe²⁺ formundaki inorganik demirin korunmasında rol oynar. Bozulmuş gastrik asit üretimi bu nedenle diyetle alınan hem olmayan demirin biyoyararlanımını azaltabilir. Mide HCl üretiminden kaynaklanan

düşük pH ortamı, enterositlerin mukus tabakasının hemen altında bulunan asidik mikro ortamın yaptığı gibi demir emilimine yardımcı olur. Bu asidik mikro ortam, hücre dışı Na^+ 'yı hücre içi H^+ ile değiştiren $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ pompası sayesinde oluşturulur. Ortaya çıkan elektrokimyasal H^+ gradyanı, hücrelerin dışından içeriye demir taşınması için itici güç sağlar (53).

Bazı diyet faktörleri demir emilimini bozabilir. Örneğin, bitki bazlı gıdalarda bol miktarda bulunan fitat ve oksalat, polifenoller ve tanenler, bağırsak lümeninde hem olmayan demiri sıkıca bağlayarak biyoyararlanımı azaltır. Ayrıca, mide asidi üretimini azaltan ilaçlar (proton pompası inhibitörleri vb.) veya patolojik durumlar (atrofik gastrit vb.) demir biyoyararlanımını azaltır, dolayısıyla emilimini bozar. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Çölyak hastalığı gibi mukozal patolojiler ve bağırsak hareketliliğinde bozulmalar da demir emilimini azaltır (53).

2.5.3. Beta Talasemi Major Hastalığında Demir Metabolizması

Beta globin zincirinin azalması veya yokluğu, alfa globin zincirinde artışa neden olur. Bu beta globin zincirinin yokluğu kemik iliğinde eritroid prekürsörlerde presipitasyona neden olur ve inefektif eritropoez meydana gelir. Beta globin zincirinin azalması ise periferik eritrositlerde membran hasara neden olur ve hemoliz meydana gelir. İnefektif eritropoez ve hemoliz sonucunda anemi meydana gelir. Bu da demir emilimini artırır (56).

Hepsidin, duodenal enterositlerin bazolateral membranında, makrofajlarda, plasental sinsityotrofoblastlarda ve hepatositlerde eksprese edilen ferroportinin hücre içi yıkımını arttırarak demirin dolaşıma salınmasını inhibe eder. Hepsidinden bağımsız olarak, ferroportin ayrıca transkripsiyonel olarak $\text{HIF2}\alpha$ ve heme bağımlı transkripsiyon faktörleri tarafından ve transkripsiyon sonrası IRE/IRP tarafından düzenlenir (57,58).

Beta talasemi hastalarında hepsidin baskılanmıştır. Hepsidin baskılanması, makrofajlardan demir salınımına izin verir ve bağırsaktan demir emilimini arttırır (56). Talasemide aşırı demir yüklenmesine rağmen hepsidin üretiminin genellikle düşük olmasının sebebi, hepsidin gen ekspresyonunun aşağıdaki faktörler tarafından inhibisyonudur:

- Artan eritrosit üretimi (stres eritropoezi) nedeniyle yüksek demir talebi vardır. Çoğalan eritroid öncüleri tarafından büyüme farklılaşma faktörü 15 (GDF-15), gastrulasyon proteini homolog 1 (TWSG1) ve hepsidin üretimini engelleyen eritroferon gibi çözünebilir faktörler üretilir.
- Oksidatif stres, transkripsiyon faktörlerini inhibe eder (Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3), histon deasetilaz aktivasyonu ve hipoksi ile indüklenabilir faktörler) (23,59–61).

Bununla birlikte, hepsidin üretimindeki azalma, kan transfüzyonları tarafından hemoglobin olarak sağlanan demir ve inflamasyon dahil olmak üzere talasemide yaygın olan diğer koşullarla dengelenir; ikisi de hepsidin üretimini arttırır. İkinci durumda, interlökin 6 ve interlökin 1 gibi proinflamatuvar sitokinler, STAT yolunu aktive ederek hepsidin gen promotörünü aktive eder (59).

Demir emilimini aneminin ciddiyeti belirler. Gastrointestinal sistemden demir emilimi sağlam bireyler yılda 0.0015 gram iken talasemililerde 2-5 gram emilmektedir. Bunu azaltmanın en etkin yolu hastaya iyi bir hemoglobin düzeyi sağlamaktır. Bunun için hemoglobin düzeyi 9 g/dL olacak şekilde düzenli kan transfüzyonu yapılmalı ve bundan kaynaklanacak demir birikimini engellemek için demir bağlayıcı ve vücuttan atıcı ilaçlar kullanılmalıdır (17).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 08/07/2021- 01/02/2023 tarihleri arasında Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği, Hemoglobinopati Tedavi Merkezi iş birliğiyle gerçekleştirildi.

Bu çalışma 2008 Helsinki Bildirgesi'nin ilkelerine uygun olarak yerel etik kurul tarafından onaylanmıştır. Katılımcılardan yazılı ve bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Çalışma için Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 08/07/2021 tarihli 10/18 karar no'lu etik kurul onayı alındı.

3.1. HASTA VE KONTROL GRUBUNUN ÖZELLİKLERİ

Beta talasemi majör hastalığı nedeniyle Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hemoglobinopati Tedavi Merkezinde takipli 52 beta talasemi majör hastası çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız 52 beta talasemi major (24 erkek, 28 kadın) hastası ve 23 sağlıklı kontrol (9 erkek, 14 kadın)'de yapıldı.

Dahil etme kriterleri:

1)SUAM Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi hemoglobinopati tedavi merkezinde takip edilen beta talasemi major hastaları

2) Beta talasemi majör hastalığı olmayan kontrol grubu

Hariç tutma kriterleri:

1)19 yaş altı hastalar ve sağlıklı kontroller

2) 50 yaş üstü hastalar ve sağlıklı kontroller

3)Demir eksikliği anemisi ve kronik hastalık anemisi bulunan sağlıklı kontrol grubu

Örneklem büyüklüğü ve istatistiksel güç hesabı G.POWER.3.1: Statistical Power Analyses for Windows V.3.1 ile yapıldı. Çalışma öncesi yapılan güç analizinde %5 tip1 hata ve minimum 95 güç ile talasemi major hasta grubunda denek sayısı 45 olarak hesaplandı(2).

3.2. LABORATUVAR ANALİZLERİ

Hasta ve kontrol grubundan polikliniklere başvuru sırasında 10-12 saat açlık sonrası sabah venöz kan örnekleri alındı. Hasta grubundan alınan kan örnekleri düzenli olarak aldıkları transfüzyon öncesine aitti.

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 yapıldı. Hastaların hemogram testlerinden RBC (Kırmızı Kan Hücresi), Hb (Hemoglobin), Hct (Hematokrit), MCV (Ortalama Eritrosit Hacmi), WBC (Beyaz Kan Hücresi), Plt (Trombosit) parametreleri değerlendirildi.

Ghrelin, HIF2 α , hepsidin, biyokimya ve hormon parametreleri için 5.0 mL hacimli jelli pıhtı aktivatörlü tüpler (Isotherm Co. Ltd.Türkiye) kullanıldı. Numuneler 5-6 kez alt-üst edilip pıhtılaşması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi ve ardından 4000 rpm'de (RCF=2862 x g) soğutmalı santrifüj cihazında (NF 1200®, Nüve san. malz. a.ş. Ankara, Türkiye) 10 dakika santrifüj edildi. Hemolizli, ikterik veya lipemik numuneler çalışma dışı bırakıldı. Elde edilen serumun bir kısmı Ghrelin, HIF2 α ve hepsidin ölçümlerinde kullanılmak üzere ependorf tüplere ayrıldı ve çalışılncaya kadar -80 °C buzdolabında saklandı. Total bilirubin, direk bilirubin, 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 kullanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Vitamin D, folik asit, vitamin B12, ferritin düzeylerinin ölçümü tam otomatik DxI 800 analizöründe (Beckman CoulterInc.,ABD) kemilüminesans olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Ghrelin Ölçümü

Bu testin ölçümünde yarışmalı immunoassay tekniği kullanıldı. Testin ölçümünde kullanılan kit içerisinde temin edilen mikro ELISA (enzim immunoassay) plakasının kuyucukları ghreline özgü bir monoklonal antikor ile önceden kaplanmıştır. Hazır halde bulunan biyotinle işaretlenmiş ghrelin ve numuneler mikrolakalardaki kuyucuklara eklendi. Biyotinle işaretlenmiş ghrelin ile işaretlenmemiş numune ghrelini arasında, kuyucuk duvarını kaplayan ghreline özgü antikor ile yarışmalı bir inhibisyon reaksiyonu oluştu. Mikrolaka 37 °C’de inhibisyon reaksiyonu bitene kadar 1 saat inkübasyonda bekletildi. Inkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra bütün mikrolaka kuyucuklarına Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge edilmiş avidin ilave edildi ve 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon sırasında HRP konjugatı biyotine bağlandı. Bağlı HRP konjugatının miktarı, numunedeki ghrelin konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Inkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra substrat çözeltisi eklenerek 37 °C’de 10-20 dakika arasında inkübasyona bırakıldı. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra oluşan rengin yoğunluğu numunedeki ghrelin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Inkübasyon süresi bittiğinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon tamamlandı. Kuyucuklarda oluşan renk değişimi 450nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ETI–Max 3000 analizöründe (DiaSorin S.p.A., İtalya) ölçüldü.

Ghrelin düzeyi ölçümünde, USCN ghrelin ELISA kiti (Katalog No: CEA991Hu, Cloud-clone corp Wuhan, Çin) kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 12.35-1,000 pg/mL, analitik duyarlılığı 4.87pg/mL idi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi. Düşük, orta ve yüksek seviyeli ghreline sahip 3 numune’de çalışma içi %CV <%10, çalışmalar arası %CV <%12 idi. ELISA'lar için kullanılan standart eğri konsantrasyonları 1,000 pg/mL, 333.33 pg/mL, 111.11 pg/mL, 37.04 pg/mL, 12.35 pg/mL idi.

3.2.2. Hipoksi ile İndüklenen Faktör 2 Alfa (HIF 2α)

Bu testin ölçümünde ELISA tekniği kullanıldı. Testin ölçümü yapılan kitte bulunan mikrolaka, HIF-2α 'ya özgü bir antikorla önceden kaplanmıştı. Standartlar veya numuneler daha sonra HIF-2α 'ya özgü biyotin ile konjuge edilmiş antikor ile

uygun mikrolaka kuyularına eklendi. Daha sonra HRP ile konjuge edilmiş Avidin her mikrolaka kuyusuna ilave edildi ve inkübasyona bırakıldı. TMB (Tetrametil benzidin) substrat solüsyonu eklendikten sonra, numunedeki HIF-2 α konsantrasyonuna göre kuyucuklarda renk değişiklikleri gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırıldı. Renk değişimi 450nm $\pm$ 10nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ETİ-Max 3000 analizöründe ölçüldü. Numunelerdeki HIF-2 α konsantrasyonu daha sonra numunelerin O.D.'sinin standart eğriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

HIF-2 α düzeyi ölçümünde, USCN HIF-2 α ELISA kiti (Katalog No: SED466Hu, Cloud-clone corp Wuhan, Çin) kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 0.156-10 ng/mL, analitik duyarlılığı 0.059 ng/mL idi. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Düşük, orta ve yüksek seviyeli HIF 2 α 'ya sahip 3 numunede çalışma içi %CV <%10, çalışmalar arası %CV <%12 idi. ELISA'lar için kullanılan standart eğri konsantrasyonları 10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL, 0.312ng/mL, 0.156ng/mL idi.

3.2.3. Hepsidin Ölçümü

Bu testin ölçümünde yarışmalı immunoassay tekniği kullanıldı. Testin ölçümünde kullanılan kit içerisinde temin edilen mikro ELISA plakasının kuyucukları hepsidine özgü bir monoklonal antikor ile önceden kaplanmıştı. Hazır halde bulunan biyotinle işaretlenmiş hepsidin ve numuneler mikrolakalardaki kuyucuklara eklendi. Biyotinle işaretlenmiş hepsidin ile işaretlenmemiş numune hepsidini arasında, kuyucuk duvarını kaplayan hepsidine özgü antikor ile yarışmalı bir inhibisyon reaksiyonu oluştu. Mikrolaka 37 °C'de inhibisyon reaksiyonu bitene kadar 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra HRP ile konjuge edilmiş avidin bütün mikrolaka kuyucuklarına eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu inkübasyon sırasında HRP konjugatı biyotine bağlanır. Bağlı HRP konjugatının miktarı, numunedeki sitrülün konsantrasyonuyla ters orantılıdır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra substrat çözeltisi ilave edildi ve 37 °C'de 10-20 dakika arasında inkübasyona bırakıldı. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra oluşan rengin yoğunluğu numunedeki hepsidin

konsantrasyonu ile ters orantılıdır. İnkübasyon süresi bittiğinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon tamamlandı. Kuyucuklarda oluşan renk değişimi 450nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ETI–Max 3000 analizöründe (DiaSorin S.p.A., İtalya) ölçüldü.

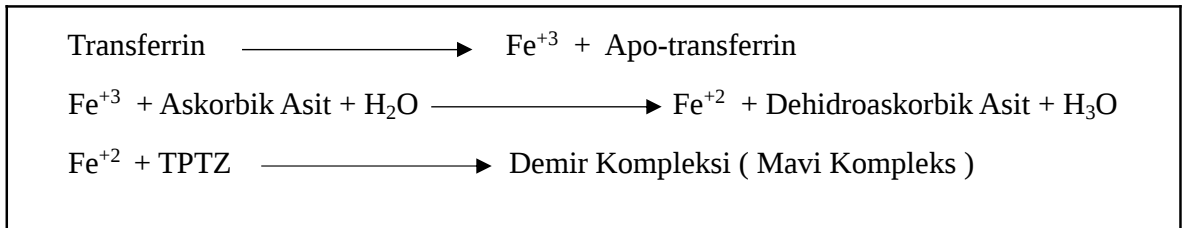
Hepsidin düzeyi ölçümünde, USCN hepsidin ELISA kiti (Katalog No: CEA979Hu, Cloud-clone corp Wuhan, Çin) kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 32 - 20,000 pg/mL, analitik duyarlılığı 11 pg/mL idi. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi. Düşük, orta ve yüksek seviyeli hepsidine sahip 3 numune’de çalışma içi %CV <%10, çalışmalar arası %CV <%12 idi. ELISA'lar için kullanılan standart eğri konsantrasyonları 20,000 pg/mL, 4,000 pg/mL, 800 pg/mL, 160 pg/mL, 32 pg/mL idi.

3.2.4. Demir Ölçümü

Demir ölçümü enzimatik yöntemle ölçüldü. Bu yöntemde kromojen olarak TPTZ (2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin) kullanılır. Asidik ortamda, transferrine bağlı demir serbest değerlikli demir iyonları ve apotransferrin halinde parçalanır. Hidroklorik asit ve sodyum askorbat, Fe^{+3} iyonlarının Fe^{+2} ‘e indirgenmesini sağlar. Fe^{+2} iyonları, TPTZ ile reaksiyona girer ve 600/800 nm’de bikromatik olarak ölçülebilen mavi renkli bir kompleks oluşturur. Absorbanstaki artış mevcut demir miktarıyla doğru orantılıdır.

Demir düzeyi ölçümünde, demir (Katalog no: OSR6186, Beckman Coulter Inc., USA) kiti kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 10-1000 μ g/dL idi. 9,59 , 28,34 ve 105,54 μ mol/L’deki çalışma içi %CV sırasıyla %1.02, %0.66 ve %0.65 ; toplam %CV ise sırasıyla %2.09 ,%1.77, %1.23 idi.

Referans aralığı: 60-180 μ g/dL



Şekil 9: Demir ölçümünde gerçekleşen reaksiyonların prensibi

3.2.5. Doymamış Demir Bağlama Kapasitesi (UIBC)

Ferro demir (Fe^{+2}), Nitroso-PSAP (2-Nitrozo-5-[N-n-propil-N-(3-sülfopropil)amino]fenol) ile reaksiyona girerek yoğun yeşil bir kompleks oluşturur. Numune, alkali pH'taki doymamış demir bağlama bölgelerindeki transfer ile özel olarak demir iyonu bağlarının bir kısmına veya tamamına eklenmişse, Nitroso-PSAP ile renk reaksiyonu için kullanılamaz. Ölçülen absorbansta meydana gelen değişimler ile seruma eklenen toplam demir miktarından kaynaklanan absorbans arasındaki fark transferrine bağlı miktara eşittir. Bu, doymamış demir bağlama kapasitesidir.

UIBC düzeyi ölçümünde, UIBC (Katalog no: OSR61205, Beckman Coulter Inc., USA) kiti kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 55-550 $\mu\text{g/dL}$ idi. 24.56 , 35.57 ve 72.54 $\mu\text{mol/L}$ 'deki çalışma içi %CV sırasıyla %2.19, %1.1 ve %0.65 ; toplam %CV ise sırasıyla %3.15 ,%1.93, %1.01 idi.

Referans aralığı: 155-355 $\mu\text{g/dL}$

3.2.6. Total Demir Bağlama Kapasitesi (TDBK)

Demir ile UIBC değerleri toplanarak hesaplanır.

3.2.7. Ferritin Ölçümü

Ferritin testi iki bölgeli immünoenzimatik (“sandviç”) bir testtir. Keçi anti ferritin alkalın fosfataz konjugatı ile keçi anti fare kaplı paramanyetik partiküller (fare monoklonal anti-ferritin kompleksleri) içeren reaksiyon kabına bir örnek alınır. Serum ferritini katı faz üzerinde immobilize monoklonal anti ferritine bağlanırken, keçi anti ferritin enzim konjugatı ferritin moleküllerindeki farklı antijen bölgeleriyle reaksiyona girer. Bir reaksiyon kabındaki inkübasyonun ardından, maddeler katı faza bağlanır ve bağlanmamış maddeler yıkanırken, manyetik bir alanda tutulur. Daha sonra kemilüminesans substrat kaba eklenir ve reaksiyonun oluşturduğu ışık bir luminometre kullanılarak ölçülür. Işık üretimi örnekteki ferritin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Örnekteki analit miktarı çok noktalı bir kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Ferritin düzeyi ölçümünde, Access ferritin (Katalog no: 33020, Beckman Coulter, Inc., USA) kiti kullanıldı. Kitin ölçüm aralığı 0.2-1500 µg/L idi.

Referans aralığı: 11-306.8 µg/L

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, ortanca, dağılım aralığı değerleri ile sunuldu. Çalışmada ele alınan her değişken için toplanan verilerin dağılımını saptamak amacıyla Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarına ait veriler arasındaki farkın analizinde normal dağılıma uyan veriler için Unpaired sample t testi, normal dağılıma uymayan veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki grup arasındaki korelasyon analizi için Spearman testi kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 22.0 paket programıyla yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya 52 beta talasemi major hastası (24 erkek (%46,1), 28 kadın (%53,8)) hastası ve 23 beta talasemi majör hastalığı olmayan birey (9 erkek (%39,1), 14 kadın (%61,9)) olmak üzere toplam 75 kişi dahil edilmiştir. Katılımcıların yaş ortalamaları hasta grubunda $29,73 \pm 6,78$, kontrol grubunda $33,26 \pm 8,22$ idi ve istatistiksel olarak yaş dağılımları her iki grupta da normal dağılıma uyuyordu. Her iki grubun yaş ortalamaları karşılaştırıldığı t-testinde gruplar arası anlamlı fark saptanmadı. Çalışmaya dahil edilen bireylerin demografik verileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Parametreler	Kontrol	Hasta
n	23	52
Yaş (Yıl)	$33,26 \pm 8,22$	$29,73 \pm 6,78$
Cinsiyet (K/E)	14/9	28/24

Tablo 1: Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri

Hasta grubuyla kontrol grubunun karşılaştırılmasında; RBC, Hb, Hct, MCV düzeyleri hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük, WBC ve Plt düzeyleri ise hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu. Hasta grubuyla kontrol grubunun RBC, Hb, Hct, MCV, WBC, Plt karşılaştırılması Tablo 2’de gösterilmiştir.

PARAMETRELER	KONTROL n=23 Ortanca (Minimum- Maksimum)	HASTA n=52 Ortanca (Minimum- Maksimum)	P Değeri
RBC (10 ⁶ /mm ³)	4,65 (4,22-6,28)	3,31 (2-64-4,23)	0,001
Hb (g/dL)	14 (8-16.6)	8.9 (7.6-11.6)	0,001
Hct (%)	41.4 (29.4-50.8)	26.9 (21.5-35.5)	0,001
MCV (µm ³)	88.7 (66.1-94.2)	82.6 (70.1-86.9)	0,001
WBC (10 ³ /mm ³)	6.96 (5.4-15.3)	12.7 (3.5-29.3)	0,001
Plt (10 ³ /mm ³)	286 (152-511)	527 (69-1330)	0,001

Tablo 2: Hasta ve kontrol gruplarının hemogram parametrelerinin karşılaştırılması

Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hasta grubuyla kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılmasında; hasta grubunda demir, ferritin, total bilirubin, direk bilirubin düzeyleri anlamlı derecede yüksek, UIBC, TDBK(total demir bağlama kapasitesi) düzeyleri ise hasta grubunda anlamlı derecede düşük bulundu. Folik asit ve vitamin B12 düzeylerinde hasta ve kontrol grubunda anlamlı fark bulunamadı. Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 3’de gösterilmiştir.

PARAMETRELER	KONTROL n=23 Ortanca (Minimum- Maksimum)	HASTA n=52 Ortanca (Minimum- Maksimum)	P Değeri
Demir (µg/dL)	89 (32-610)	212 (39-395)	0,001
UIBC (µg/dL)	249 (13-413)	34 (0-269)	0,001
TDBK (µg/dL)	348 (248-623)	249 (62-473)	0,001
Ferritin (µg/L)	30.7 (5-122.8)	370.2 (89-10783)	0,001
Total Bilirubin (mg/dL)	0.63 (0.31-1.48)	2.28 (0.86-7.07)	0,001
Direk Bilirubin(mg/dL)	0.10 (0.04-0.34)	0.47 (0.15-0.96)	0,001
Folik Asit (µg/L)	8.14 (4.02-24.02)	7.53 (2.22-22.54)	0,452
Vitamin B12 (ng/L)	250 (101-437)	269 (152-1025)	0,059

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması

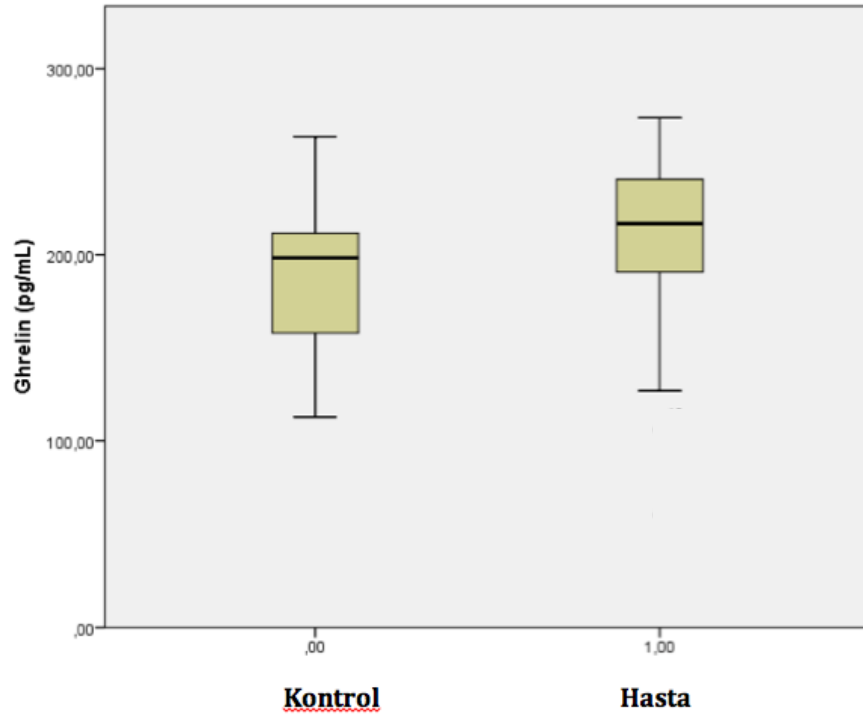
Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hasta grubuyla kontrol grubunun ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametrelerinin karşılaştırılmasında; hasta grubunda ghrelin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu. HIF2 α ve hepsidin düzeylerinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamadı. Hasta ve kontrol grubunun ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 4’de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubu ghrelin, hepsidin ve HIF2 α düzeylerinin karşılaştırılması boxplot grafiğinde verilmiştir (Şekil 9, 10, 11).

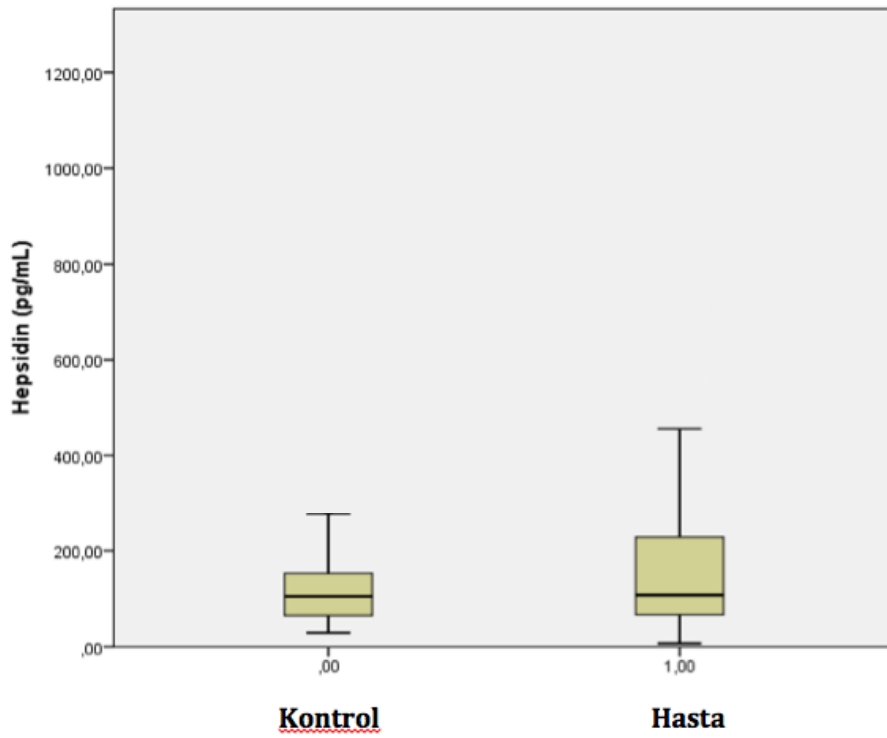
PARAMETRELER	KONTROL n=23 Ortanca (Minimum- Maksimum)	HASTA n=52 Ortanca (Minimum- Maksimum)	P Değeri
Ghrelin (pg/mL)	198,38 (49,32-263,33)	216,83 (60,36-273,53)	0,018
HIF-2α (ng/mL)	0,72 (0,15-1,87)	1,03 (0,04-4,26)	0,078
Hepsidin (pg/mL)	105,29 (29,38-597,04)	107,96 (7,18-1139,72)	0,629

Tablo 4: Hasta ve kontrol grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametrelerinin karşılaştırılması

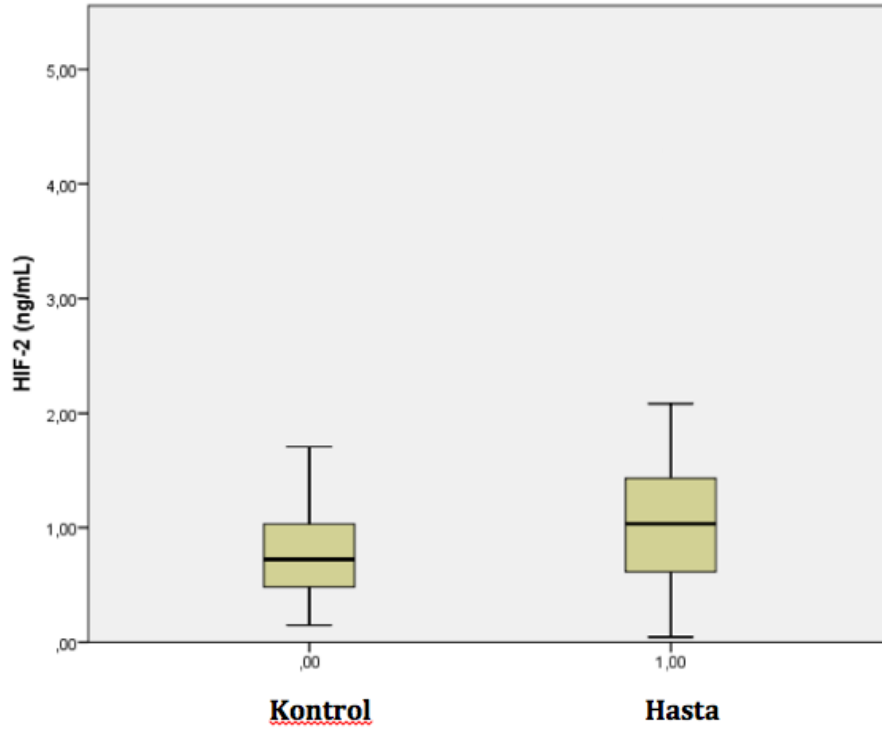
Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.



Şekil 10: Hasta ve kontrol grubunda ghrelin düzeylerinin boxplot grafiği



Şekil 11: Hasta ve kontrol grubunda hepsidin düzeylerinin boxplot grafiği



Şekil 12: Hasta ve kontrol grubunda HIF-2 düzeylerinin boxplot grafiği

Kontrol grubunda Ghrelin-HIF2 α , Ghrelin-Hepsidin, HIF2 α -Hepsidin' in birbirleriyle olan korelasyonları incelendiğinde parametreler arasında korelasyon görülmedi. Kontrol grubunun ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi Tablo 5' de gösterilmiştir.

İlişkili Parametreler	r	p
Ghrelin-HIF2α	0,108	0,62
Ghrelin-Hepsidin	-0,023	0,91
HIF2α-Hepsidin	-0,061	0,78

Tablo 5: Kontrol grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi

Gruplar arası korelasyon analizinde Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

Hasta grubunda Ghrelin-HIF2 α , Ghrelin-Hepsidin, HIF2 α -Hepsidin' in birbirleriyle olan korelasyonları incelendiğinde; Ghrelin-HIF2 α arasında zayıf pozitif korelasyon bulundu. Hasta grubunun ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi Tablo 6' da gösterilmiştir.

İlişkili Parametreler	r	p
Ghrelin-HIF2α	0,285	0,04
Ghrelin-Hepsidin	-0,128	0,36
HIF2α-Hepsidin	0,163	0,24

Tablo 6: Hasta grubunun Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametreleri arasındaki korelasyon analizi

Gruplar arası korelasyon analizinde Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

Hasta ve kontrol grubunda ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametrelerinin demir, UIBC, TDBK ve ferritin parametreleriyle korelasyonları incelendiğinde; hasta grubunda ghrelin-ferritin ve HIF2 α -UIBC arasında pozitif korelasyon bulundu. Hasta ve kontrol grubundaki diğer parametreler arasında korelasyon bulunmadı. Hasta ve kontrol grubunda ghrelin, HIF2 α ve hepsidin parametrelerinin demir, UIBC, TDBK ve ferritin parametreleriyle korelasyon analizi Tablo 7'de gösterilmiştir.

PARAMETRELER	KONTROL n=23 r	HASTA n=52 r
Ghrelin-Demir	-0,32	0,10
Ghrelin-UIBC	0,13	0,10
Ghrelin-TDBK	0,27	0,094
Ghrelin-Ferritin	0,012	0,411*
HIF2 α -Demir	-0,288	-0,086
HIF2 α -UIBC	-0,051	0,291*
HIF2 α -TDBK	-0,166	-0,008
HIF2 α -Ferritin	-0,230	0,099
Hepsidin-Demir	0,118	-0,212
Hepsidin-UIBC	-0,288	-0,085
Hepsidin-TDBK	-0,186	-0,172
Hepsidin-Ferritin	0,136	0,121

Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunda Ghrelin, HIF2 α ve Hepsidin parametrelerinin Demir, UIBC, TDBK ve Ferritin parametreleriyle korelasyon analizi

* : p <0.05

Gruplar arası korelasyon analizinde Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Hemoglobinopatiler dünya genelinde en yaygın monogenik hastalıklardan biridir. Küresel popülasyonun yaklaşık %1-5'inin genetik talasemi mutasyonu taşıyıcısı olduğu tespit edilmiştir (15). Ülkemizde akraba evliliklerinin fazla olması, genetik geçişli bir hastalık olan talaseminin görülme sıklığını arttırmaktadır. Türkiye’de, talasemi ve orak hücre anemisi başta olmak üzere, kalıtsal kan hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir (22). Tedavisiz kalması durumunda ekstramedüller eritropoez ve anormal şekilli eritrositlerin dalakta yıkılması sonucunda hipersplenizm, aşırı demir yüklenmesine bağlı olarak kalp ve endokrin organlarda birikim meydana gelir. İlerleyen aşamalarda hipogonadotropik hipogonadizm, osteoporoz, diyabet, hipotiroidi, hipoparatiroidi, karaciğer fibrozisi gibi komplikasyonlar görülebilir (17,62).

Globin zincir oranındaki dengesizlik ve eşlenmemiş zincirlerin çökmesi sonucunda etkisiz eritropoez ve hemolitik anemi meydana gelir (63,64). Talasemi majör hastalığında, RBC indeksleri hipokrom mikrositer anemi gösterir. Hemogram sonucunda düşük Hb seviyesi (<7 g/dl), MCV 50-70 fl ve MCH 12-20 pg gözlenir. Lökosit ve trombosit sayıları normal veya hafif yüksektir (19,65). Tedavi altındaki düzenli kan tranfüzyonu yapılan hastalarda talasemi intermediada görülmesi beklenen RBC indeks değerleri görülebilmekle beraber yine de sağlıklı popülasyona göre daha düşüktür. Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da hasta grubunun RBC ($10^6/\text{mm}^3$) 3,31 (2-64-4,23), Hb (g/dL) 8.9 (7.6-11.6), Hct (%) 26.9 (21.5-35.5), MCV (μm^3) 82.6 (70.1-86.9) olarak kontrol grubuna göre düşük bulundu (1,19,62).

RBC'lerin aşırı yıkımı ve ekstramedüller hematopoez, transfüzyon gereksinimini artıran splenomegaliye neden olur. Bu komplikasyondan kaçınmak için sıklıkla splenektomi yapılır, böylece kan transfüzyonu sıklığı azaltılır. Splenektomi sonrası değişken membranlara sahip eritrosit ve trombositlerin yıkımı azalır. Splenektomi uygulanan hastaların %75'inde trombositoz gelişir ve %15'inde 1.000.000 hücre/mm³ veya daha fazlasına ulaşır (10,66). Çalışmamızdaki WBC

($10^3/\text{mm}^3$) 12.7 (3.5-29.3), Plt ($10^3/\text{mm}^3$) 527 (69-1330) değerleri ise literatürdeki verilere benzer olarak hasta grubunda kontrol grubuna göre hem WBC hem de Plt değeri yüksek bulundu (1,11,65).

Ayrıca hematolojik indeks ölçümlerimizi yaptığımız otomatik hematoloji analiz cihazı XN (Sysmex, Kobe, Japonya), empedans ve akış sitometrisinin bir kombinasyonu ile kan hücrelerini sayar ve sınıflandırır. RBC/Plt kanalı, kırmızı kan hücrelerini (RBC) ve trombositleri (Plt) yüzey akışı doğru akım algılama yöntemi kullanarak ölçer (67). Empedans sayımı, hematoloji analizörleri tarafından en sık kullanılan yöntemdir. İletken bir sıvıdaki bir açıklıktan geçerken elektrik direncindeki anlık değişime dayalı olarak hücreleri numaralandırır ve sınıflandırır. Empedanstaki değişiklik parçacığın hacmiyle orantılı olduğundan, bu yöntem Plt'yi boyutlarına göre diğer hücrelerden ayırır. Ancak mikrositik veya parçalanmış kırmızı kan hücreleri, hücre kalıntıları, beyaz hücre parçaları mevcut olduğunda interferans vererek artmış trombosit sayılarına neden olabilir. Mikrositozun en sık görülen nedenleri demir eksikliği, talasemi sendromları ve kronik hastalık anemisi (68–70). Bu durum bizim çalışmamızda da hasta grubundaki bu trombosit yüksekliğinin diğer bir sebebi olabilir.

β -talasemi hastalarında tekrarlayan kan transfüzyonları, inefektif eritropoez, gastrointestinal sistemden ilerleyici demir Emilimi ve retiküloendotelial demir geri dönüşümü nedeniyle aşırı demir yüklenmesi meydana gelir. Yapılan çalışmalar gastrointestinal sistemden demir Emiliminin eritroid genişlemenin şiddetine bağlı olarak yılda 2 ile 5 gr arasında değiştiğini yani demir Emilim hızının normalden yaklaşık 3-4 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Düzenli transfüzyonlar demir birikim oranını iki katına çıkarabilir. Bu hastalarda inefektif eritropoez genellikle zamanla kötüleşerek anemi, demir Emilimi ve splenomegalide şiddetlenmeye yol açar. Progresif aşırı demir yüklenmesi birden fazla organı etkiler ve β -talasemi hastalarında başlıca ölüm nedenidir (71). Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da hasta grubunun demir ($\mu\text{g/dL}$) 212 (39-395) değeri kontrol grubu demir ($\mu\text{g/dL}$) 89 (32-610) değerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (11,24,63,72).

Ferritin, vücuttaki ana demir depolama proteindir. Ferritinin %54,5 protein, %12,1 nükleik asit ve %35 ferrik oksit-hidroksitten oluştuğunu gösterilmiştir (50).

Yaklaşık 4500-5000 demir atomu içerebilen multimerik bir proteindir (51). Sentezi, IRE/IRP yoluyla demir miktarları tarafından düzenlenir. Hücre içindeki demire bağlanarak demir homeostazında merkezi rol üstlenir. Transferrin saturasyonundaki yükselmeye beraber ferritin düzeylerindeki artış, genellikle aşırı demir yüklenmesini gösterir (73). Erkeklerde 300 ng/mL'nin ve kadınlarda 200 ng/mL'nin üzerindeki ferritin seviyeleri, %45'in üzerinde transferrin saturasyonu saptandığında sebebi detaylandırılmalıdır. Talasemide oluşan demir yüküne bağlı ferritin düzeyleri yüksek saptanmıştır (73–76).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak hasta grubundaki UIBC ($\mu\text{g/dL}$) 34 (0-269), TDBK ($\mu\text{g/dL}$) 249 (62-473) düzeyleri düşük bulundu. Ferritin düzeyleri ise hasta grubunda 370.2 (89-10783) yüksek bulundu. Diğer taraftan ferritin aynı zamanda pozitif akut faz reaktandır ve romatizmal, hematolojik ve enfeksiyöz hastalıklar dahil olmak üzere inflamatuvar durumlarda yükselir (74). Örneğin, pandeminin başlarında ferritin, COVID-19'un ciddiyetinin ve prognostik faktörünün bir belirteci olarak görev yaptı (50). Bu nedenle ferritin yüksekliğinin diğer bir nedeni inflamasyon olabilir ancak çalışmamızda inflamatuvar marker veya sitokin ölçümü yapmadığımız için bu nedeni dışlayamayız.

İnefektif eritropoez ve azalmış kırmızı hücre sağkalımı, β -talasemide anemi ve diğer komorbiditelerin temel sebepleridir. Azalan β -zinciri üretimi, hem üretiminden ayrılmaya yol açar, bu da eşleşmemiş α -globin zincirlerinin fazlalığına ve serbest hem artışına neden olur. Bu süreç, hücre olgunlaşmasında bloğa, artmış apoptoza ve inefektif eritropoeze yol açan, ciddi hücresel oksidatif hasara sahip yoğun ROS üretimi ile sonuçlanır. Olgunlaşan retikülositler ve eritrositlerde artan ROS hemolize neden olur ve periferik dolaşımda kırmızı hücre sağkalımını kısaltır (77). Retiküloendotelial sistemdeki (öncelikle dalak ve lenf düğümleri, karaciğerdeki Kupffer hücreleri) fagositik makrofajlar yıkılacak eritrositleri dolaşımdan temizler. Eritrositlerdeki hemoglobin globin ve heme parçalanır. Globin, amino asitlere geri dönüştürülür; hem oksitlenir ve ardından sırasıyla hem oksijenaz ve biliverdin redüktazla unkonjuge bilirubine indirgenir (78). Talasemi artan eritrosit üretimi ve hemoliz, artmış hemoglobin yıkım ürünleriyle sonuçlanır. Yapılan çalışmalarda talasemi hastalarının bilirubin sonuçları yüksek bulunmuştur (79–81). Bizim

çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak total bilirubin (mg/dL) 2.28 (0.86-7.07), direk bilirubin (mg/dL) 0.47 (0.15-0.96) düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

Eritropoez, kemik iliğinin hematopoietik dokusunun kırmızı kan hücreleri (eritrositler) ürettiği süreçtir. Normal bir insan eritrositinin ortalama ömrü yaklaşık 120 gündür. Eritrositlerin kanama veya hemoliz nedeniyle dolaşımdan anormal şekilde kaybolduğu durumlarda, yeni eritrosit üretim hızı günde bir trilyonu geçebilir. Aktif eritropoez için folat, B12 vitamini ve demir çok önemli rollere sahiptir. Folat, bir poliglutamil kuyruğu ile para-aminobenzoata bağlı bir pteridin (2-amino-4-hidroksi-pteridin) halkasından oluşur. İndirgenmiş tetrahidrofolat (THF) formu, tek karbonlu birimlerin transferinde çoklu biyokimyasal reaksiyonlarda kofaktör görevi görür. B12 vitamini (kobalamin), 5,6-dimetilbenzimidazolil ribonükleotide bağlı kobalt içeren tetrapirrol (korin) halkasından oluşur. Eritroblastlar, farklılaşmaları sırasında proliferasyon için folat ve vitamin B12'ye ihtiyaç duyarlar. Folat veya vitamin B12 eksikliği, pürin ve timidilat sentezlerini inhibe eder, DNA sentezini bozar ve etkisiz eritropoezden kaynaklanan anemi ile sonuçlanan eritroblast apoptozuna neden olur. Eritropoez sırasındaki yüksek proliferasyon oranları, eritroid progenitör hücreleri folat veya vitamin B12 eksikliğinde bozulan DNA sentezine diğer hücre türlerinden daha duyarlı hale getirir (82).

Bazı çalışmalarda artmış turn-over sebebiyle talasemi hastalarında meydana gelen folat ve vitamin B12 eksikliği bildirilmiştir (83,84). Başka bir çalışmada hasta grubunda vitamin düzeyleri normal bulunmuş, aldıkları folat ve vitamin B12 takviyeleri kesildiğinde düşüş gözlemlenmiştir (85). Bizim çalışmamızda hasta grubunda folik asit ($\mu\text{g/L}$) 7.53 (2.22-22.54), vitamin B12 (ng/L) 269 (152-1025) olarak bulundu ve kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüklük saptanmadı. Bunun sebebinin hastaların aldığı folat ve vitamin B12 takviyelerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

İnsanlarda demir emilimi, vücudun eritropoietik demir talebi, doku oksijenasyonu ve vücudun demir depolarının toplam etkisi tarafından düzenlenir. Hepatositler tarafından üretilen hepsidin, demir homeostazının kontrolünde yer alan anahtar hormondur. Hepsidin ferroportine bağlanarak endositozunu ve parçalanmasını

indükler ve hücrel demir akışının inhibisyonuna yol açar (76). Hepsidin ekspresyonu aşırı demir yüklenmesi ve inflamasyonda artar, demir eksikliği ve hipoksi durumlarında azalır (27). Ancak talasemide yapılan çalışmalarda aşırı demir yüklenmesine rağmen hepsidin üretimi düşük bulunmuştur. Bunun olası sebebi ise hepsidin gen ekspresyonunun GDF-15, TWSG1, eritroferon gibi faktörler tarafından inhibisyonudur (23,59–61). Eritroferon (ERFE), EPO uyarımı üzerine eritroblastlar tarafından sentezlenen TNF α ailesinin bir üyesidir. ERFE dolaşıma salınır ve demire yanıt olarak BMP (özellikle BMP6) üzerinden hepsidin sinyalini zayıflatır. Ek olarak, hepsidin lokusunda histon deasetilaz tarafından bir epigenetik baskılama meydana gelir. Anemi hipoksiye neden olduğunda, farklı hücre tipleri tarafından salınan PDGF-BB gibi diğer araçlar da aynı zamanda hepsidini baskılar (86).

Düşük serum hepsidin düzeylerinin bağırsak demir emilimini arttırdığı ve makrofajlardaki demir depolarını azaltarak aşırı demir yüküne yol açtığı bilinmektedir. Birçok çalışma, β -talasemi hastalarında düşük serum hepsidin düzeylerinin, artmış demir emilim seviyelerine ve aşırı demir yüküne yol açabileceğini göstermiştir. Terapötik bir hedef olarak hepsidin, talasemi hastalarında aşırı demir yükünün yönetimine yardımcı olabilir (71,76). Çünkü β -talasemik farelerde hepsidin ekspresyonundaki ılımlı bir artışın aşırı demir yüklenmesini sınırladığını, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığını ve anemiye iyileştirdiğini gösteren çalışmalar vardır (71,87,88).

Bizim çalışmamızda talasemi major hasta grubundaki hepsidin (pg/mL) 107,96 (7,18-1139,72) değeri kontrol grubu hepsidin (pg/mL) 105.29 (29.38-597.04) değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Hepsidin ile demir parametreleri arasındaki korelasyonu incelediğimizde hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda beklenenin aksine hepsidinin baskılanmamasının sebebi, hastalara optimum Hb düzeylerinde tutulacak şekilde kan tranfüzyonu yapılması ve kontrollü bir demir şelasyon tedavisi uygulanması olabilir. Ayrıca hastalardan alınıp çalışmamıza dahil edilen kan numuneleri tranfüzyon öncesine ait olup, bu hastaların kan değerleri açısından en düzensiz dönemini yansıtır. Oysa bu dönemde düşük hemoglobin değerleri ve hasta bazında ulaşabilecekleri en düşük hepsidin seviyelerinde olmalarını bekleriz. Hepsidin kısa yarı ömre ve hızlı bir

renal klirens sahiptir. Hastalarda transfüzyon öncesi alınan kanlarda hepsidin normal değerlerde ölçülmesi belki de tedavi sonrası yüksek hepsidin seviyelerine ulaştığının göstergesi olabilir. Bu da hasta grubumuzdaki tedavinin etkin olduğunu yansıtabilir. Normal şartlar altında demir yüklenmesi durumunda beklediğimiz yüksek hepsidin seviyeleri tedaviye verilen cevabın etkinliğinin göstergesi olarak kullanılabilir.

Enterosite demir alımında HIF-2 α önemli bir role sahiptir ve EPO üretiminin birincil düzenleyicisidir. Demir ilişkili yollar, bağırsakta HIF-2 α 'yı özel olarak düzenler. Bununla birlikte, demirin şelasyonu hücrelerde hem HIF-1 α hem de HIF-2 α 'yı aktive ederken, demirden yoksun diyetler farelerin bağırsağında seçici olarak HIF-2 α ekspresyonunu indükler. Ayrıca, IRP1 etkileşiminin HIF-2 α protein ekspresyonunun fizyolojik düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (33). HIF-1 α , akut hipoksiye yanıt olarak aktive olurken, HIF-2 α kronik hipoksi ile ilişkilidir (34). İntestinal HIF-2 α ; demir eksikliği, eritropoez ve hepsidin eksikliği durumlarında demir emiliminin kritik bir düzenleyicisidir. HIF-2 α , apikal demir absorpsiyon genleri DMT1, DcytB ve bilinen tek bazolateral eksporteri ferroportinin kritik bir düzenleyicisidir. Demir için artan talep sonrasında bağırsakta HIF-2 α yüksek oranda aktive olur ve bu da demir emiliminde adaptif bir artışa yol açar (89,90). Hepsidin/ferroportin ekseninin, demire bağımlı prolil hidroksilaz enzimlerinin aktivitesini sınırlayarak HIF-2 α 'yı kontrol ettiği farelerde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda HIF-2 α 'nın farmakolojik blokajı, bir fare modelinde aşırı demir yüklenmesini başarıyla tedavi etmiştir (91). Aneminin intestinal hipoksiyi indüklediği ve aşırı demir emiliminin aşırı demir yüklenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterildiğinden, β -talasemi hastalarında intestinal HIF-2 α kritik öneme sahiptir. Literatürde demir yükü olan hastalıklarda intestinal HIF-2 α 'nın yükseldiği gösterilmiştir (89,90).

Çalışmamızda talasemi major hasta grubunda HIF-2 α (ng/mL) düzeyleri 1.03 (0.04-4.26) olarak saptandı ve kontrol grubu HIF-2 α (ng/mL) düzeyleri 0.72 (0.15-1.87) ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bunun nedeni bizim çalışma grubumuzda hepsidin düzeylerinin de baskılanmış bulunmaması ve hepsidin ile HIF2 α arasındaki kontrol mekanizmasının bulunması olabilir. Bu durum bize hasta grubunun

devam eden tedavilerinin etkin olduğunu düşündürebilir. Ayrıca hastalarımızın ortalama Hb düzeyleri 8,9 g/dL olarak ölçüldü. Bu Hb düzeyleri HIF-2 α 'nın sentezinde artışa neden olmamış olabilir. HIF-2 α ile demir parametreleri arasındaki korelasyonu incelediğimizde ise kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda ise HIF-2 α -UIBC arasında anlamlı korelasyon olduğunu tespit ettik. Bunun sebebi beta talasemi hastalarında demir yüküne rağmen artan demir talebi sonucu UIBC'nın azalması ve artan demir talebinin HIF-2 α için uyarıcı olması olabilir.

Ghrelinin açlık durumunda iştahı artırma ve gıda alımını uyarma etkisi bilinen bir özelliğidir. İştah, enerji homeostazını düzenleyen nöropeptitler aracılığıyla merkezi sinir sistemi tarafından kontrol edilir. Ghrelin beyin çeşitli bölgelerinde ifade edilen ghrelin reseptörlerini aktive eder ve enerji homeostazının hipotalamik regülasyonunda yer alır (3). Literatürde ghrelin ile DEA'de görülen iştahsızlık arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar bulunmaktadır (41–43). DEA bir açlık durumudur. DEA'nın üç farklı evresinde de (hipoferritinemi/demir eksikliği/Demir eksikliği anemisi) hem ghrelin hem de plazma demir içeriğinin azaldığı, demir eksikliği anemisi evresinde olan çocuklarda ise en düşük seviyelere ulaştığı gösterilmiştir. Plazmada bu iki parametre arasında anlamlı bir pozitif korelasyon saptanmıştır. Ayrıca DEA'lı prepubertal çocuklarda hem ghrelin hem de demir düzeylerinin kontrollere göre önemli ölçüde düşük olduğu gösterilmiştir. Yapılan başka 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, bu da demir tedavisinin serum hepsidin ve ghrelin sentezinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (7,41,43). Bu bulgular ghrelinin demir metabolizmasında veya demirin ghrelin sentezinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Beta talasemi beta globin üretimindeki defekt nedeniyle eritroid öncüllerin artan yıkımıyla karakterize, demir birikimine rağmen intestinal demir emiliminin arttığı bir hastalık grubudur. Beta talasemi hastalarında ghrelin düzeyinin araştırılması, ghrelinin demir metabolizmasındaki yerini öğrenmek açısından önemlidir. Literatürde puberte dönemindeki beta talasemi hastalarında ghrelinin puberte ve üreme fonksiyonu üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada serum ghrelin düzeylerinin

kontrol grubundan daha düşük olduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar ghrelin seviyesinin düşüklüğünün beta talasemi hastalarındaki puberte döneminde büyüme gelişme geriliğine bağlı olduğunu belirtmişlerdir (2). Diğer bir çalışmada Karamifar ve arkadaşları talasemi major ve talasemi intermedia hasta grubunda leptin ve ghrelin düzeyiyle kısa ve zayıf vücut yapısı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Beta talasemi major hasta grubunda kontrol grubuna göre ghrelin seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin büyüme geriliğine telafi edici bir tepki veya ghrelin seviyesinin artmasına neden olan kısmi bir direnç olabileceğini belirtmişlerdir (92). Maalesef biz literatürde bu 2 çalışma dışında beta talasemi hastalarında ghrelin düzeylerinin araştırıldığı çalışmaya rastlamadık.

Biz çalışmamızda serum ghrelin düzeylerini hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulduk (Tablo 4). Oysa Kashanian ve arkadaşları yaptığı çalışmada bunun tersine ghrelin düzeylerini düşük bulmuştur (2). Karamifar ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise bizi destekleyici nitelikte ghrelin düzeylerini hasta grubunda yüksek bulmuştur (92). Bu iki çalışma arasındaki farklı sonuçlar çalışmaya dahil edilen beta talasemi hastalarının yaş dağılımı farklılığından kaynaklanabilir.

Beta talasemi hastalarında demir emiliminde HIF2 α , hepsidin, ferroportin düzeylerinin değiştiğine dair literatürde çok sayıda çalışma olduğunu tespit etmemize rağmen, ghrelin ve demir metabolizması arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaya rastlamadık. Ghrelin ile demir metabolizması arasındaki ilişkiyi araştıran Lou ve arkadaşları çalışmalarını farelerdeki hücre kültürü çalışmalarında yapmışlardır. Bu çalışmada ghrelinin farelerin dalağında GHSR1 α , GOAT , hepsidin ,ferritin hafif zinciri ve ferroportin1 ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (7). Ghrelinin ferroportin ekspresyonunu arttırdığını gösteren bu çalışma bize ghrelinin demir metabolizmasında rolü olduğunu düşündürdü. Bilindiği üzere HIF2 α ferroportinin sentezinde rol oynamaktadır. Beta talasemi hastalarında HIF2 α ve ferroportin düzeyleri demir emiliminde önemli bir role sahiptir. Biz bu çalışmamızda HIF2 α , hepsidin ve ghrelin düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyerek beta talasemi major hastalarında demir emilim metabolizmasına katkıda bulunmaya çalıştık.

Çalışmamızda ghrelin ile demir parametreleri (demir, UIBC, TDBK, ferritin) arasındaki korelasyonu incelediğimizde kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon

saptanmadı. Hasta grubunda ise serum ghrelin-ferritin arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğunu tespit ettik (Tablo 7). Bu bulgu bize ghrelin senteziyle ferritin düzeyleri arasında bir ilişki olduğunu düşündürdü. Bizim bulgularımızı literatürle karşılaştırdığımızda daha çok demir eksikliği anemisinin tedavisiyle birlikte artan ferritin ve ghrelin düzeylerinin olduğu yayınlar bulunmaktadır. Demir eksikliği anemisinde ghrelin seviyelerinin düşük olması ve sonrasında yapılan tedaviler ile ghrelin seviyelerinin yükselmesi ghrelin sentezi için demirin gerekliliğini düşündürdü. Biz çalışmamızda moleküler düzeyde ghrelin sentezini incelemediğimiz için sadece ghrelin ile ferritin düzeyleri arasında bir ilişki olduğunu gösterebildik. Sentez yollarının belirlenmesi için moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.1. ÇALIŞMA KISITLILIKLARI

Çalışmamıza katılan hasta grubu 18-45 yaş arası ve tedavi altında olan yetişkin bir gruptur. Bu nedenle hepsidin, HIF2 α , ghrelin düzeyleri, beta talasemi major hastalığındaki temel etkileri göstermede yeterli olmayabilir.

Çalışmamız beta talasemi major hastalarında tedavi protokolüne göre planlanmış kan tranfüzyonu öncesinde alınan kan örneklerinden yapılmıştır. Bu nedenle hepsidin HIF2 α ve ghrelin düzeylerine ait olan veriler hasta değerlerinin en düzensiz olduğu döneme denk gelmektedir. Tedavi sonrasında aynı kişilerden tekrar kan alınmadığı için bu parametrelerin tedaviyle değişimi hakkında yorum yapamıyoruz.

Çalışmamız serum örneklerinden yapıldığı için hücresel düzeyde hepsidin, HIF2 α ve ghrelinin etkileşimini gösteremedik. Beta talasemi major hastalarında demir emilim metabolizmasının açıklanmasında bağırsak hücrelerinde yapılacak olan hücre kültür çalışmalarıyla hepsidin, HIF2 α ve ghrelin daha detaylı incelenebilir. Daha geniş gruplarda, hücresel düzeyde yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- 1) Hasta grubuyla kontrol grubu kıyaslandığında eritrosit indeksleri (RBC, Hb, Hct, MCV), WBC, Plt seviyeleri; total bilirubin, direkt bilirubin düzeyleri literatürle uyumlu bir şekilde anlamlı farklılıklar gösterdi.
- 2) Hasta grubuyla kontrol grubu kıyaslandığında serum folik asit ve vitamin B12 düzeyleri arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bunun nedeninin hastaların folik asit ve vitamin B12 takviyesi alması olduğunu düşündük.
- 3) Hasta grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında serum hepsidin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Serum hepsidin düzeylerinin kontrol grubuyla aynı düzeylerde olması tedavinin etkinliğinin bir göstergesi olabilir. Hastalardaki terapötik etkinliğin kontrolü açısından serum hepsidinin yüksek seviyelerde olması hedeflenebilir.
- 4) Hasta grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında serum HIF2 α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Hastalarımızın ortalama Hb miktarlarının 8,9 g/dL olması bu Hb düzeylerinin HIF2 α 'nın sentezinde artışa neden olmadığını düşündürdü. Özellikle hastalarda kan transfüzyon sıklığının belirlenmesinde 9 g/dL Hb değerleri baz alınabilir.
- 5) Hasta grubu ile kontrol grubu serum ghrelin düzeyleri kıyaslandığında beta talasemi major hastalarında serum ghrelin düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. Hastalardaki ghrelin düzeyi yüksekliğinin demir metabolizmasında önemli bir role sahip olduğunu düşündürdü.
- 6) Hasta grubunda serum ghrelin ve ferritin düzeyleri arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon olduğu gösterildi. Hem demir eksikliği tedavisi sonrasında artan ferritin düzeylerine sekonder olarak hem de talasemi gibi ferritin yüksekliğiyle seyreden hastalıklarda serum ghrelin düzeylerinin yüksek olması ghrelin sentezlenmesinde ferritin düzeylerinin indükleyici bir role sahip olduğunu düşündürebilir.
- 7) Hasta grubunda ghrelin ve HIF2 α arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Beta talasemi major hastalığında HIF2 α sentezlenmesinde ghrelin etkisini olduğunu düşündürdü.

- 8) Hasta grubundaki ghrelin ve ferritin seviyeleri arasındaki tespit edilen pozitif korelasyonun diğ er bir nedeni ghrelin hormonunun ferritin sentezini arttırması olabilir. Talasemi hastalarındaki hemokromatozun oluşmasında y uksek ghrelin seviyeleri de rol oynuyor olabilir. Yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalarda ghrelin antagonistleri kullanılarak hemokromatoz üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. 2010;1–15.
2. Moshtaghi-Kashanian GR, Razavi F. Ghrelin and leptin levels in relation to puberty and reproductive function in patients with beta-thalassemia. *Hormones*. 2009;8(3):207–13.
3. Ghrayeb H, Elias M, Nashashibi J, Youssef A, Manal M, Mahagna L, et al. Appetite and ghrelin levels in iron deficiency anemia and the effect of parenteral iron therapy: A longitudinal study. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(6):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0234209>
4. Kucuk N, Orbak Z, Karakelloğlu C, Akcay F. The effect of therapy on plasma ghrelin and leptin levels, and appetite in children with iron deficiency anemia. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019;32(3):275–80.
5. Perchard R, Clayton PE. Ghrelin and Growth. *Endocr Dev*. 2017;32:74–86.
6. Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;26(1):3–11.
7. Luo QQ, Zhou YF, Chen MYJ, Liu L, Ma J, Zhang MW, et al. Fasting up-regulates ferroportin 1 expression via a Ghrelin/GHSR/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2018;233(1):30–7.
8. Wang C, Babitt JL. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. 2016;
9. Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab* [Internet]. 2015;22(5):777–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>
10. Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat How I treat thalassemia. 2016;118(13):3479–89.
11. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. *Seminars in Thalassemia*. 2017;6736(17).
12. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. *Hemoglobin Variants : Biochemical Properties and Clinical Correlates*. 2013;
13. Muncie HL, Campbell JS. *Alpha and Beta Thalassemia*. 2009;
14. Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW. *Population Screening for Hemoglobinopathies*. 2018;(May):1–26.
15. Motta I, Bou R, Ali F, Maria TT, Cappellini D. Beta Thalassemia : New Therapeutic Options Beyond Transfusion and Iron Chelation. *Drugs* [Internet]. 2020;80(11):1053–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01341-9>
16. Viprakasit V. Clinical Classification , Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Clin NA* [Internet]. 2018;32(2):193–211. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.006>
17. Eleftheriou A. Talasemi hakkında herşey. (4).
18. Kutlu M, Çekmiş H, Başak M, Osman N, Açıkgöz Ö, Sevindir İ, et al. *Talasemiler*. *BakırköyTıp Derg* [Internet]. 2006;2(2):33–40. Available from:

- <http://www.bakirkoytip.org/pdf/141200723552-2-1.pdf>
19. Origa R. β -Thalassemia. 2016;(September):1–11.
 20. Weatherall DJ. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia. 2018;32:165–75.
 21. Kattamis A, Luca G, Yesim F, Vip A. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassemia. 2020;(August):692–703.
 22. Hemoglobinopati Kontrol Programı [Internet]. [cited 2023 Jan 2]. Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/cocukergen-tp-liste/hemoglobinopati-kontrol-programi.html>
 23. Oikonomidou PR, Rivella S. What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia? Blood Rev [Internet]. 2018;32(2):130–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.10.001>
 24. Pinto VM, Forni GL. Management of Iron Overload in Beta-Thalassemia Patients : Clinical Practice Update Based on Case Series. 2020;
 25. Asadov C, Alimirzoeva Z, Mammadova T, Aliyeva G, Gafarova S, Mammadov J. β -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. Int J Hematol [Internet]. 2018;108(1):5–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2411-9>
 26. Taher AT ;Khale. MMDC. β -Thalassemias. 2021;727–43.
 27. Agarwal AK, Yee J. Hepcidin. Adv Chronic Kidney Dis. 2019;26(4):298–305.
 28. Saneela S, Iqbal R, Raza A, Qamar MF. Hepcidin : A key regulator of iron. :1170–4.
 29. Ginzburg YZ. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. Vitam Horm. 2019;110:17–45.
 30. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, et al. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. J Biol Chem. 2009;284(36):24155–67.
 31. Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN. Hepcidin : regulation of the master iron regulator. 2015;1–12.
 32. Corrado C, Fontana S. Hypoxia and HIF signaling: One axis with divergent effects. Int J Mol Sci. 2020;21(16):1–17.
 33. Xu MM, Wang J, Xie JX. Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors. Sheng Li Xue Bao. 2017;69(5):598–610.
 34. Ban HS, Uto Y, Nakamura H. Hypoxia-inducible factor (HIF) inhibitors: a patent survey (2016–2020). Expert Opin Ther Pat [Internet]. 2021;31(5):387–97. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1874345>
 35. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. Diabetologia. 2021;64(4):709–16.
 36. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. J Cell Physiol. 2018;233(12):9087–98.
 37. Nunez-Salces M, Li H, Feinle-Bisset C, Young RL, Page AJ. The regulation of gastric ghrelin secretion. Acta Physiol. 2021;231(3):0–2.
 38. Lv Y, Liang T, Wang G, Li Z. Ghrelin, A gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. Biosci Rep. 2018;38(5).

39. Yanagi S, Sato T, Kangawa K, Nakazato M. The Homeostatic Force of Ghrelin. *Cell Metab* [Internet]. 2018;27(4):786–804. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.008>
40. Chen Y, Han X, Wang L, Wen Q, Li L, Sun L, et al. Multiple roles of ghrelin in breast cancer. 2022;37(39):241–8.
41. Akarsu S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y, Aygun AD. Plasma ghrelin levels in various stages of development of iron deficiency anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29(6):384–7.
42. Isguven P, Arslanoglu I, Erol M, Yildiz M, Adal E, Erguven M. 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):985–90.
43. Dogan A, Alioglu B, Dindar N, Dallar Y. Increased Serum Hepcidin and Ghrelin Levels in Children Treated for Iron Deficiency Anemia. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(1):81–5.
44. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
45. Zeidan RS, Han SM, Leeuwenburgh C, Xiao R. Iron homeostasis and organismal aging. 2022;1–32.
46. Chifman J, Laubenbacher R, Torti S V. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2014;844:201–25.
47. Ward R. An update on disordered iron metabolism and iron overload. *Hematology*. 2010;15(5):311–7.
48. Weber S, Parmon A, Kurrle N, Schnütgen F, Serve H. The Clinical Significance of Iron Overload and Iron Metabolism in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol*. 2021;11(February):1–18.
49. Rybinska I, Cairo G. Mutual Cross Talk Between Iron Homeostasis and Erythropoiesis [Internet]. 1st ed. Vol. 105, Erythropoietin. Elsevier Inc.; 2017. 143–160 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2017.01.001>
50. Mahroum N, Alghory A, Kiyak Z, Alwani A, Seida R. Ferritin – from iron , through inflammation and autoimmunity , to COVID-19. 2020;(January).
51. Plays M, Müller S, Rodriguez R. Chemistry and biology of ferritin. *Metallomics*. 2021;13(5).
52. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2017;106:1559S-1566S.
53. Doguer C, Ha JH, Collins JF. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Compr Physiol*. 2018;8(4):1433–61.
54. Lane DJR, Richardson DR. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption! *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;75:69–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.007>
55. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era Correspondence : 2020;105(2).
56. Ali S, Mumtaz S, Abdullah H, Muhammad S, Muhammad H, Samaira T, et al. Current status of beta- - thalassemia and its treatment strategies. 2021;(January 2020):1–14.

57. Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone. 2017;
58. Nairz M, Weiss G. Iron in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2020;75.
59. Fibach E, Dana M. Oxidative Stress in β -Thalassemia. *Mol Diagnosis Ther* [Internet]. 2019;23(2):245–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0373-5>
60. Srole DN, Ganz T. Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *J Cell Physiol.* 2021;236(7):4888–901.
61. Rivella S, Melchiori L, Gardenghi S. β -thalassemia: HiJAKing ineffective erythropoiesis and iron overload. *Adv Hematol.* 2010;2010.
62. Tubman VN, Fung EB, Vogiatzi M, Thompson AA, Rogers ZR, Neufeld EJ, et al. Guidelines for the Standard Monitoring of Patients With Thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015;37(3):e162–9.
63. Sundh A, Kaur P, Palta A, Kaur G. Utility of screening tools to differentiate beta thalassemia trait and iron-deficiency anemia - Do they serve a purpose in blood donors? *Blood Res.* 2020;55(3):169–74.
64. Khandros E, Kwiatkowski JL. Beta Thalassemia: Monitoring and New Treatment Approaches. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2019;33(3):339–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.01.003>
65. Lichtman MAKKT PMLJBOA. Williams Manual of Hematology [Internet]. Ninth Edit. 2017. Available from: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
66. Merchant RH, Shah AR, Ahmad J, Karnik A, Rai N. Post Splenectomy Outcome in β -Thalassemia. *Indian J Pediatr.* 2015;82(12):1097–100.
67. Sandhaus LM, Osei ES, Agrawal NN, Dillman CA, Meyerson HJ. Platelet counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100, and Advia 120: A comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(2):235–41.
68. Lakos G, Mukhtar Z, Masi L, Valente S, Papa F. Alinity hq platelet count is not impacted by severe microcytosis. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(4):1–5.
69. Boulassel MR, Al-Farsi R, Al-Hashmi S, Al-Riyami H, Khan H, Al-Kindi S. Accuracy of platelet counting by optical and impedance methods in patients with thrombocytopaenia and microcytosis. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2015;15(4):e463–8.
70. Tantanate C, Khowawisetsut L, Pattanapanyasat K. Performance evaluation of automated impedance and optical fluorescence platelet counts compared with international reference method in patients with thalassemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(6):830–6.
71. Gardenghi S, Ramos P, Marongiu MF, Melchiori L, Breda L, Guy E, et al. Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in β -thalassemic mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4466–77.
72. Shantanam S, MUELLER. Altered erythropoiesis and iron metabolism in carriers of thalassemia. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139–48.
73. Estevão IF, Peitl J, Bonini-Domingos CR. Serum ferritin and transferrin saturation levels in β 0 and β + thalassemia patients. *Genet Mol Res.* 2011;10(2):632–9.

74. Hsu CC, Senussi NH, Fertrin KY, Kowdley K V. Iron overload disorders. *Hepatol Commun.* 2022;6(8):1842–54.
75. Rujeerapaiboon N, Tantiworawit A, Piriyaakuntorn P, Rattanathammethee T, Hantrakool S, Chai-Adisaksopha C, et al. Correlation Between Serum Ferritin and Viral Hepatitis in Thalassemia Patients. *Hemoglobin* [Internet]. 2021;45(3):175–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/03630269.2021.1926277>
76. Tantiworawit A, Khemakapasiddhi S, Rattanathammethee T, Hantrakool S, Chai-Adisaksopha C, Rattarittamrong E, et al. Correlation of hepcidin and serum ferritin levels in thalassemia patients at Chiang Mai University Hospital. *Biosci Rep.* 2021;41(2):1–8.
77. Matte A, Federti E, Kung C, Kosinski PA, Narayanaswamy R, Russo R, et al. The pyruvate kinase activator mitapivat reduces hemolysis and improves anemia in a β -thalassemia mouse model. *J Clin Invest.* 2021;131(10):1–12.
78. Sullivan JI, Rockey DC. Diagnosis and evaluation of hyperbilirubinemia. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017;33(3):164–70.
79. Gilliland BC. Hemolytic Anemia. *Autoimmune Dis.* 2006;557–74.
80. Huang YY, Huang MJ, Wang HL, Chan CC, Huang CS. Bilirubin concentrations in thalassemia heterozygotes in university students. *Eur J Haematol.* 2011;86(4):317–23.
81. Laksmiawati DR, Handayani S, Udyaningsih-Freisleben SK, Kurniati V, Adhiyanto C, Hidayat J, et al. Iron status and oxidative stress in β -thalassemia patients in Jakarta. *BioFactors.* 2003;19(1–2):53–62.
82. Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: The roles of folate, vitamin B 12, and iron. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:105–31.
83. Paniz C, Lucena MR, Bertinato JF, dos Santos MNN, Gomes GW, Figueiredo MS, et al. Serum folate and cytokines in heterozygous β -thalassemia. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(6):718–26.
84. Fung EB. Nutritional deficiencies in patients with thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1202:188–96.
85. Baghersalimi A, Hemmati Kolachahi H, Darbandi B, Kamran Mavardiani Z, Alizadeh Alinodehi M, Dalili S, et al. Assessment of Serum Folic Acid and Homocysteine in Thalassemia Major Patients before and after Folic Acid Supplement Cessation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2018;40(7):504–7.
86. Pagani A, Nai A, Silvestri L, Camaschella C. Hepcidin and Anemia: A Tight Relationship. *Front Physiol.* 2019;10(October):1–7.
87. Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, et al. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4880–8.
88. Casu C, Oikonomidou PR, Chen H, Nandi V, Ginzburg Y, Prasad P, et al. Minihepcidin peptides as disease modifiers in mice affected by β -thalassemia and polycythemia vera. *Blood.* 2016;128(2):265–76.

89. Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S, Deschemin JC, Vaulont S, Peyssonnaud C. Deletion of HIF-2 α in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood*. 2012;119(2):587–90.
90. Anderson ER, Taylor M, Xue X, Ramakrishnan SK, Martin A, Xie L, et al. Intestinal HIF2 α promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(50).
91. Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, Jain C, Jurkovic MT, Wu J, et al. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest*. 2019;129(1).
92. Karamifar H, Bahmanyar M, De Sanctis V, Karimi M. Leptin and ghrelin serum concentrations in thalassemia major and intermedia patients and normal subjects. *Riv Ital di Med dell'Adolescenza*. 2010;8(2):29–33.

