



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, ANKARA BİLKENT ŞEHİR
HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**TALASEMİ HASTALARININ HEMOLİZATLARINDA HEMOGLOBİNE
BAĞLI OLMAYAN DEMİR BİRİKİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra YILDIRIM DEMİRÇİN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2025



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, ANKARA BİLKENT ŞEHİR
HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**TALASEMİ HASTALARININ HEMOLİZATLARINDA HEMOGLOBİNE
BAĞLI OLMAYAN DEMİR BİRİKİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra YILDIRIM DEMİRÇİN

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Salim NEŞELİOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2025

TEŞEKKÜR

Bu zorlu tez sürecimin her adımında yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen, tezimin literatüre katkı sağlayacak şekilde özgün ve orijinal olması için benden çok çaba harcayan ve bunu başarmamızı sağlayan, tezimin hazırlık ve yazım sürecinde bütün meşguliyetlerine rağmen bana zaman ayıran, sabır ve anlayışla katkıda bulunan sayın hocam Doç. Dr. Salim NEŞELİOĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, uzmanlık eğitimi dışında bilim insanı olmamız, yenilikçi fikirler üretmemiz ve bu alanda çok çalışmamız gerektiğini ben ve asistan arkadaşlarıma her zaman öğütleyen, bizlere sadece asistanlık eğitimimiz süresince değil hayatımızın her alanında ve her sürecinde özellikle mentor olarak sonrasında da bir baba gibi destek veren sayın hocam Prof. Dr. Özcan EREL'e; ilk makalemin yazımında ve yayınlanmasında bana destek olan, bilgi ve görüşlerini hiç eksik etmeyen, bilgi birikimi ve tecrübesini bizlere her zaman hissettiren ve özellikle bana birçok özelliğiyle yön veren sayın hocam Prof. Dr. Gülsen YILMAZ'a; asistanlık sürecim boyunca mesleğimi sevmemi ve mesleğimin inceliklerini bana öğretmeye çalışan sayın hocalarım Prof. Dr. Fatma MERİÇ YILMAZ, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Prof. Dr. Turan TURHAN, Prof. Dr. Ceylan BAL, Doç. Dr. Sevilay SEZER, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Merve ERGİN TUNÇAY, Doç. Dr. Esra FIRAT OĞUZ, Doç. Dr. Funda EREN, Doç. Dr. Mehmet Fatih ALPDEMİR, Başasistan Emiş Deniz AKBULUT'a;

Biyokimya uzmanlığı adına bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli uzmanlarımıza;

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum başta sevgili dostum her koşulda bana yoldaş olan desteklerini hiç esirgemeyen güzel kalpli Zeliha KOCAİSMAİL olmak üzere bütün asistan arkadaşlarıma;

Çalışmalarımız sırasında ihtiyaç duyduğumuz anda yardımlarını esirgemeyen teknisyen arkadaşlarıma;

Beni bugünlerime getiren hayatımın her alanında her zaman iyi kötü her koşulda yanımda olan ve bana destek veren annem Türkan YILDIRIM, babam Selahattin YILDIRIM ve kardeşlerime;

Karşılaştığım her zorlukta yanımda olup bana destek olan, bana her koşulda güvenen, inanan, tez süreci boyunca yaşadığım stresi göğüslememde yardımcı olan yaşam yolumu paylaştığım hayat arkadaşım, yoldaşım sevgili eşim Mustafa İsmail DEMİRÇİN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 DEMİR.....	4
2.1.1 Demir Emilimi.....	6
2.1.2 IRP-IRE Sinyal Yolu ile Demir Homeostazının Modülasyonu.....	9
2.1.3 Vücutta Demirin Bağlı Bulunduğu Yerler.....	11
2.1.4 Karaciğer ve Demir.....	12
2.1.5 Demir İçeren Proteinler.....	13
2.1.6 Demir ile İlişkili Parametrelerin Biyokimyasal Ölçümler.....	14
2.1.7 Demir Durum Göstergelerinin Standardizasyonu.....	14
2.1.8 Demir Ölçümü.....	15
2.1.9 Labil Demir Formu.....	15
2.1.10 Demir ile İlişkili Hastalıklar.....	16
2.1.10.1 Demir Eksikliği.....	16
2.1.10.2 Demir Birikimi.....	17
2.2 TALASEMİ.....	18
2.2.1 Patogenez.....	19
2.2.2. Talasemi Sınıflandırması.....	20
2.2.2.1 Alfa Talasemi.....	20
2.2.2.2 Beta Talasemi.....	21
2.2.3 Talasemilerin Laboratuvar Tanısı.....	23
2.2.3.1 Tarama ve Doğrulama Testleri.....	23
2.2.3.2 Prenatal Tanı.....	23

2.2.4 Talasemilerde Tedavi.....	25
2.2.4.1 Eritrosit Transfüzyonu.....	25
2.2.4.2 Demir Şelasyon Tedavisi.....	27
2.2.4.3 Splenektomi.....	33
2.2.4.4 Kök Hücre Transplantasyonu.....	33
2.2.4.5 Gen Terapisi.....	33
2.2.5 Uzun Dönem Sağlık Problemleri.....	34
2.2.5.1 Kardiyovasküler Sistem.....	34
2.2.5.2 Karaciğer.....	35
2.2.5.3 Büyüme-Gelişme.....	36
2.2.5.4 Endokrin Sistem.....	37
2.2.5.5 Kemik-İskelet Sistemi.....	38
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	39
3.1 Gerekli Materyaller.....	39
3.1.1 Kimyasallar ve Kullanılan Diğer Malzemeler.....	39
3.1.2 Cihazlar.....	39
3.2 Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri.....	40
3.2.1 Beta Talasemi Majör Hasta Grubu.....	40
3.2.2 Kontrol Grubu.....	41
3.3 Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	41
3.4 Rutin Tetkiklerde Yapılan Analizler.....	42
3.5 Analiz Öncesi Yapılan Ön İşlemler.....	43
3.6 Eritrosit İçi Non-Hem Demir Ölçümü.....	43
3.7 İstatistiksel Değerlendirme.....	44
4. BULGULAR.....	44
4.1 Geleneksel Demir Ölçüm Yöntemine Uygulanan Minör Modifikasyonlar.....	44
4.1.1 Aplikasyonda Yapılan Değişiklikler.....	44
4.1.2 Linearite (Doğrusallık).....	45
4.1.3 Saptama Sınırı.....	49
4.1.4 Kesinlik Çalışması.....	49
5. TARTIŞMA.....	56

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR.....	66
8. EKLER.....	74
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	



SİMGELER VE KISALTMALAR

CBC	Tam kan sayımı
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CV	Varyasyon katsayısı
DCYTB	Duodenal sitokrom B
DFO	Desferrioksamin
DMT-1	Divalan metal transporter 1
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EP	Eritrosit protoporfirini
EP 7	Değerlendirme Protokolü 7
EPO	Eritropoetin
Fpn	Ferroportin
HCP1	Hem taşıyıcı protein 1
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IRE	Demire duyarlı element
IRP	Demir düzenleyici protein
LIP	Kararsız demir havuzu
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Kantitasyon sınırı
LPI	Kararsız plazma demiri
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama eritrosit hacmi

MR	Manyetik rezonans görüntüleme
NTBI	Transferrine bağılı olmayan
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RDW	Kırmızı hücre dağılım genişliğı
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
SF	Serum ferritin
STEAP3	Prostatın ferriredüktaz altı-transmembran epitel antijeni 3
STfR	Çözünür transferrin reseptörü
SQUID	Süperiletken kuantum girişim aygıtı
TfR-1	Hepatositler yüzey reseptörü
TIBC	Toplam demir bağlama kapasitesi
UIBC	Doymamış demir bağlama kapasitesi
UTR	Transkriptlerinin çevrilmemiş bölgesi
ZPP	Çinko protoporfirinin

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Beta Talasemi majör ve beta talasemi intermediada ayırt edici klinik ve laboratuvar özellikler (8).....	22
Tablo 2. Beta Talasemi majörlü hastaların komplikasyon izlem planı (8).....	24
Tablo 3. Beta talasemi majörlü hastalarda eritrosit transfüzyon ilkeleri (8).....	26
Tablo 4. Şelasyon tedavisinin izlenmesinde serum ferritinin kullanımı (64).....	28
Tablo 5. MRG ve biyopsi ile karaciğer demir konsantrasyon tespitinin gerekçesi, avantajları ve dezavantajları (64).....	29
Tablo 6. Beta talasemi tedavisinde kullanılan demir şelatörlerinin karşılaştırılması (8).....	32
Tablo 7. Geleneksel Demir Ölçüm Yöntemi ve Modifiye Edilen Eritrosit İçi Non-Hem Demir Ölçüm Yöntemi Arasındaki Farklar (70,72).....	45
Tablo 8. Düşük, orta ve yüksek seviyelerdeki eritrosit içi non-hem demir ölçümlerinin kesinlik/tekrarlanabilirlik sonuçları	50
Tablo 9. Talasemi ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri açısından karşılaştırılması.....	51
Tablo 10. Talasemi ve sağlıklı kontrol grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu.....	53
Tablo 11. Talasemi hasta grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu.....	53
Tablo 12. Sağlıklı kontrol grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Diyetle alınan demirin intestinal lümeninden emilimi (26).....	7
Şekil 2.	Transferrinin klatriin aracılı endositozu (25).....	8
Şekil 3.	IRP-IRE sinyal yolu ile çeviri modülasyonunun mekanizması (30).....	10
Şekil 4.	İnsanlarda hücrel demir homeostazını gösteren diyagram (31).....	11
Şekil 5.	Demir içeren proteinlerin yapısı (20).....	13
Şekil 6.	β talaseminin patogenezi (64).....	19
Şekil 7.	Talasemi majör hastalarında kemik değışiklikleri (66).....	20
Şekil 8.	Demir yüklenmesinin toksik etkilerine ilişkin mekanizmaların özeti (64).....	26
Şekil 9.	Talasemi hastalarında kardiovasküler komplikasyonların patogenezi (64).....	34
Şekil 10.	Talasemi hastalarında pulmoner hipertansiyona neden olan mekanizma (64).....	35
Şekil 11.	Talasemi hastalarında demir birikiminin karaciğere etkileri (64).....	36
Şekil 12.	Talasemi hastalarında büyüme-gelişmeyi etkileyen kısa boya sebep olan faktörler (64).....	36
Şekil 13.	Talasemi hastalarında endokrin sistem komplikasyonlarının etyopatogenezi (64).....	37
Şekil 14.	Eritrosit içi non-hem demir ölçüm yöntemi linearite grafiğı A) 500 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık B) 40 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık C) 30 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık D) 20 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık E) 10 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık F) 5 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık G) 2 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık.....	46

Şekil 15. Sağlıklı kontrol ve talasemi hasta grubunda standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin error bar grafiği ($\bar{x} \pm \sigma\bar{x}$).....52

Şekil 16. Şelasyon tedavisi olarak deferasiroks alan hastalar ve hiç ilaç kullanmayan hastalar arasında hemoglobin başına düşen demir düzeyi error bar grafiği ($\bar{x} \pm \sigma\bar{x}$).....55



ÖZET

Amaç: Talasemi hastalarında sık transfüzyonlarla birlikte vücutta demir birikimi olmaktadır. Hastalardaki demir birikimini değerlendirmek için sıklıkla invaziv olmayan indirekt yöntemle vücuttaki demiri gösteren ferritin düzeyi izlemi yapılmaktadır. Biz çalışmamızda talasemi hastalarının eritrositleri içinde bulunan hemoglobine bağlı olmayan demiri ölçerek demir yükünde meydana gelen değişimi ferritinin aksine direkt olarak hücre düzeyinde değerlendirmeyi amaçlamaktayız.

Gereç ve Yöntem: Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Pediatri polikliniğine başvuran 10-35 yaş arası beta talasemi majör hastalığına sahip kişiler talasemi hasta grubuna seçilmiştir. Kontrol grubuna Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Aile Hekimliği polikliniğine 10-35 yaş arası genel muayeneye gelen sağlıklı kişiler dahil edilmiştir. Katılımcıların rutin ölçümler için laboratuvara ulaşan numunelerinden hemolizat elde edilmiş ve etanol-kloroform karışımıyla hemoglobinler uzaklaştırılmıştır. Kalan süpernatantta otomatik analizörde eritrosit içi non-hem demir ölçümü gerçekleştirilmiştir. Çıkan sonuçlar standardizasyon sağlanması için katılımcıların hemoglobin değerlerine bölünmüştür.

Bulgular: Çalışmaya 47 tanesi β -talasemi majör hasta grubunda, 53 tanesi de sağlıklı kontrol grubunda olmak üzere 100 gönüllü birey dahil edilmiştir. Katılımcıların standardize edilmiş eritrosit içi non-hem demir düzeyleri ölçülmüş ve sağlıklı kontrol grubunda 1,17 $\mu\text{g/g}$ iken talasemi hasta grubunda 1,64 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir. Talasemi hastalarında standardize eritrosit içi non-hem demirin ferritinle arasında anlamlı korelasyon tespit edilmiştir ($r= 0,3$; $p= 0,048$). Talasemi hastalarında deferasiroks kullanan 27 hasta ve hiçbir ilaç kullanımı olmayan 10 hastanın standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyleri incelendiğinde medyan değerler sırasıyla 1,24 $\mu\text{g/g}$ ve 1,72 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur ($p= 0,005$).

Sonuç: Günümüzde demir yükü izlemi sıklıkla indirekt olarak serum ferritin düzeyi izlenerek ya da direkt olarak Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR) ve biyopsi ile yapılmaktadır. Demir yükü takibini daha kolay, ucuz, teknik tecrübe gerektirmeyen ve en önemlisi direkt hücre düzeyinde değerlendirecek şekilde eritrosit içi hemoglobine

bağlı olmayan demir ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Hemoglobın başına düşen demir düzeyi aynı zamanda talasemide ilaç kullanımı olan ve olmayan hastalarda da demir birikimi hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Demir, Demir Birikimi, Beta Talasemi, Eritrosit



ABSTRACT

Aim: Iron accumulation in the body occurs with frequent transfusions in thalassaemia patients. In order to evaluate iron accumulation in patients, ferritin level, which shows iron in the body, is frequently monitored by non-invasive indirect method. In our study, we aimed to evaluate the change in iron load directly at the cell level by measuring the non-haemoglobin-bound iron in the erythrocytes of thalassaemia patients in contrast to ferritin.

Materials (Patients) and Methods: Individuals between the ages of 10 and 35 years with beta thalassemia major who sought care at the Ankara Bilkent City Hospital Pediatrics outpatient clinic were selected to comprise the thalassemia patient group. The control group consisted of healthy individuals within the same age range who attended the Family Medicine outpatient clinic of Ankara Bilkent City Hospital for a general examination. Hemolysate was obtained from the samples of the participants who arrived at the laboratory for routine measurements, and the hemoglobins were removed with an ethanol-chloroform mixture. The remaining plasma was then analyzed for intra-erythrocyte non-heme iron using an automatic analyzer. Finally, the results were divided by the respective hemoglobin values to ensure standardization.

Results: In study, 100 volunteer individuals, 47 in the β -thalassaemia major patient group and 53 in the healthy control group, were included. Standardised intra-erythrocyte non-heme iron levels of the participants were measured and found to be 1.64 $\mu\text{g/g}$ in the thalassaemia patient group compared to 1.17 $\mu\text{g/g}$ in the healthy control group. A significant correlation was found between standardised intra-erythrocyte non-heme iron and ferritin in thalassaemia patients ($r= 0.3$; $p= 0.048$). When the standardised intra-erythrocyte non-heme iron levels of 27 patients using deferasirox and 10 patients without any drug use in thalassaemia patients were analysed, the median values were found as 1.24 $\mu\text{g/g}$ and 1.72 $\mu\text{g/g}$, respectively ($p= 0,005$).

Conclusion: Currently, iron load monitoring is frequently performed indirectly by monitoring serum ferritin level or directly by Magnetic Resonance Imaging (MRI) and

biopsy. An iron measurement method that is easier, cheaper, does not require technical experience and most importantly, does not depend on intra-erythrocyte haemoglobin has been developed to evaluate iron load directly at the cellular level. The iron level per haemoglobin also provides information about iron accumulation in patients with and without drug use in thalassaemia.

Key Words: Iron, Iron Overload, Beta thalassaemia, Erythrocytes



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demir, vücutta oksijen taşınması, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu ve enerji üretimi gibi hayati fonksiyonları devam ettirmek için gerekli hücresel süreçlerde kritik rol oynar (1). Canlı hücrelerde, demir ağırlıklı olarak hem ve demir-kükürt kümeleri gibi fonksiyonel gruplara bağlı halde bulunur, vücuttaki depo formları da ferritin ve hemosiderindir (2-5). Demir, demir metabolizmasının farklı aşamalarında birbirlerine dönüşebilen, ferröz demir Fe(II) ve ferrik demir Fe(III) iyonları olarak isimlendirilen iki farklı formda bulunur. Bununla birlikte, vücutta kararsız demir havuzu olarak bilinen çok az miktarda bağlı olmayan demir iyonu bulunur bu da redoks aktif formda reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize eder (2,3,6). Bu nedenlerden dolayı demir düzeyi, homeostazisi ve demir redoks durumu sıkı bir şekilde kontrol edilir (1). Bu sıkı denetimin ve bozulan demir metabolizmasının önemli indikatörlerinden biri serum demir düzeyinin ölçülmesidir. Günümüzde serum demir düzeyi, genellikle ferrozin ve ferene kromojenlerinin kullanıldığı kolorimetrik yöntemlerle ölçülmektedir.

Yetişkinler günlük 1-2 mg demiri diyetle vücuda alırlar, fazla demiri atacak mekanizma da olmadığından vücuttaki düzeyi sıkı bir şekilde kontrol edilir (2,7). Talasemi, hemakromatoz, myelodisplastik sendrom gibi hastalıklar demir metabolizmasını etkileyen demir birikimiyle karakterizedir. Ayrıca demir; karaciğer, kalp, sinir sistemi vb. dokularda birikerek ilgili organlarda fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak siroz, kardiyomiyopati, Friedreich's Ataksisi, Alzheimer, Huntington gibi hastalıklara sebep olur (1).

Talasemi normal globin zincirlerinden bir veya birkaçının sentezinin azalması veya yokluğu ile karakterize bir grup kan hastalığını ifade eder. Klinik şiddetlerine ve transfüzyon gereksinimlerine bağlı olarak transfüzyona bağımlı ve transfüzyona bağımlı olmayan talasemiler şeklinde ikiye ayrılabilir (7). Beta talasemi majör grubundaki hastalarda Hb A sentezi çok azdır ve Hb F total hemoglobinin %80'den fazlasını oluşturmaktadır. Bu grup hastalar doku oksijenlenmesini sağlamak ve inefektif eritropoezi baskılamak amacıyla sıklıkla transfüzyona bağımlıdır (8). Aynı zamanda transfüzyona bağımlı hastaların vücuttaki demir birikimini önlemek için bir

süre sonra demir şelasyon tedavilerine başlamaları gerekmektedir. Dokudaki demir birikimini direkt olarak belirlemek için karaciğer biyopsisi ve kardiyak MR (Manyetik rezonans görüntüleme) gibi uygulamalar mevcuttur. Fakat bu uygulamalar girişimsel, zaman alıcı, maliyetli, uygun ortam gerektiren külfetli yöntemlerdir. Bu nedenle demir şelasyon tedavisine başlama kararı ve doz ayarlaması sıklıkla vücutta biriken doku demirini gösteren ferritin düzeyinin izlemi yapılarak karar verilmektedir (8). Serum ferritini vücut demir depolarını indirekt olarak gösteren en sık kullanılan teknik olarak karışımıza çıkmaktadır. Demir şelasyon tedavilerindeki amaç serum ferritin düzeylerini 500-1000 ng/ml arasında tutmaktır (8).

Sık transfüzyonlarla vücutta biriken demir sadece karaciğer, kalp, sinir sistemi gibi dokuları değil eritroid hücreleri de etkilemektedir (9). Demir birikimi doku demirinde olabileceği gibi serbest/labıl olarak tanımlanan demir şeklinde de olabilmektedir. Literatür incelendiğinde serbest demir 'reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etme yeteneğini koruyacak şekilde bağlanmış demir' olarak tanımlanırken, labıl demir 'düşük afiniteli ligandlara bağlı demir iyonu' olarak açıklanmıştır (4,9,10). Önceki çalışmalarda sıklıkla labıl plazma demiri olarak adlandırılan transferrine bağlı olmayan plazma demiri ölçülmekle birlikte (11,12) eritrosit içi labıl demiri kalseinle boyayarak flow sitometri ile analiz eden yayınlar da mevcuttur (4,5,9). Yine başka bir çalışmada eritrosit içerisindeki serbest demir HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile ölçülmüştür (13). Ancak hem HPLC hem flow sitometri gibi yöntemler her laboratuvarında bulunmayan, teknisyen tecrübesi gerektiren pahalı ve zor tekniklerdir. Talasemi hastalarında demir şelasyon tedavisine başlama kararı ve tedavi dozunu etkileyen parametre bilindiği gibi serum ferritin takibidir. Ancak serum ferritin takibinin bazı ciddi dezavantajları bulunmaktadır. Serum ferritini demir yükünün indirekt göstergesidir, yüksek demir yüküne doğrusal olmayan bir tepki gösterir, takiplerde serum ferritinde azalmanın olmaması yanıtı engellemez (7). Bunun yanında ferritin bir pozitif akut faz reaktanıdır ve birçok durumda serum düzeyleri artmaktadır bu da talasemi hastalarında birikime bağlı bir artma mı oldu yoksa enfeksiyona bağlı bir artma mı olduğu konusunda ayrımı zorlaştırmaktadır.

Biz çalışmamızda geleneksel serum demir ölçümü için kullanılan kolorimetrik yöntemi modifiye ederek, eritrositlerden elde ettiğimiz hemolizat numunesinde hemoglobine bağlı olmayan demiri ölçmeyi amaçlamaktayız. Bizim modifiye

ettiğimiz yöntemle eritrosit içinde bulunan ve hemoglobine bağlı olmayan (non-hem) demir ölçülerek demir yükünde meydana gelen değişimi ferritinin aksine direkt olarak hücre düzeyinde değerlendirmeyi amaçlamaktayız.

Literatür incelendiğinde bu çalışmanın eritrosit içinde hem grubuna bağlı olmayan demiri kolorimetrik yöntemle ölçen ilk çalışma olduğu görülmektedir. Bu çalışmanın özgünlüğü, ferritin ölçümüne kıyasla interferanslardan etkilenmeyen, hücresel demir birikimini ölçerek tedavi yanıtı ve izlem için kullanılan demir yükünü dolaylı olarak değil direkt olarak değerlendirebilmesidir. Bu sayede talasemi hastalarında demir yükünü ölçebilecek şekilde tasarlanmış olan bu çalışma ilerde demirle ilişkili diğer hastalıklarda da demir yükünü ya da eksikliğini değerlendirmeye olanak sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demir

Demir 26 atom numarasına sahip periyodik tabloda d-blokta yer alan bir metaldir. Dünya kabuğunda en bol bulunan dördüncü element olmasıyla birlikte kütle olarak bakıldığında en yaygın elementtir (14). Yeryüzünde bol miktarda bulunmasının yanında yaşayan organizmalarda da bulunur ve önemli görevlerde rol alır. İnsan vücudunda demir, elektron transfer etme özelliği sayesinde birçok biyomolekülün yapısında kofaktör olarak rol almakta, hücre solunum, elektron taşınması ve DNA sentezi gibi birçok işlevi bulunmaktadır (14,15). Demir vücutta demir deposu olarak ferritin ve hemosiderinde, hem formu olarak miyoglobin ve hemoglobine bağlı, transferrin ve apotransferrinde transfer edilebilen formda, labil demir havuzu olarak adlandırılan rijit olmayan bağa sahip halde ve doku demiri olarak birçok farklı şekillerde farklı kompartmanlarda bulunmaktadır (4,16).

Demir, demir metabolizmasının farklı aşamalarında birbirlerine dönüşebilen, ferröz demir Fe(II) ve ferrik demir Fe(III) iyonları olarak isimlendirilen iki yaygın formda bulunur. Demirin daha az yaygın bir diğer formu da kararsız ferrat (Fe VI) iyonudur (14,17). Yaygın bulunan iki formun vücutta farklı görevleri vardır. Ferrik demir oksijen atomlarını koordine ederken, ferröz demir iyonu nitrojen ve kükürt atomları içeren ligandlara bağlanır. Bu durum her iki formun da toksisitesinden sorumludur (7,17).

Demir aynı zamanda vücutta hem proteini olarak ya da heme bağlı olmayan demir-sülfür bileşiği şeklinde bulunmaktadır. Hem proteinleri, porfirin halkasından oluşur. Porfirin halkasında dört nitrojen atomu ve merkezde bir demir atomu bulunur. Hem içeren proteinler hemoglobin, hemosiyanin, miyoglobin, nöroglobin, sitogloblin, sitokrom P450, sitokrom c oksidaz, katalaz ve peroksidazdır. Yapısında aktif bölgesinde demir bulunan ama hem porfirin halkası bulunmayan proteinlere non-hem demir proteinleri denir. Bunlara örnek olarak lipoksijenazlar, izopenisilin N-sentaz, aromatik aminoasit hidroksilazlar, hemetrim, bazı ribonükleotid redüktazlar ve ferritin verilebilir (18,19).

Demir canlı organizmada birçok farklı bileşik oluşturabilir. Asetat, sülfat, sülfid, oksit, nitrat, karbonat ve hidroksit gibi fonksiyonel gruplar ile demirin oluşturduğu komplekslerin birçok işlevi bulunmaktadır. Demirin insan vücudundaki önemi elektron kazanıp kaybetmedeki yeteneği ve aynı zamanda kofaktör olarak görev yapabilmesidir. Bu yetenek sayesinde demir birçok farklı biyokimyasal olayda rol oynayabilmektedir (14,20).

Demir içeren metalloenzimlerin ana işlevleri:

Oksijen transportu: En bilinen örneği hemoglobin molekülünün taşıdığı oksijendir. Hemoglobin molekülü dört hem grubuna sahiptir ve her bir hem grubu demiri bağlayacak özelliktedir, böylece bir hemoglobin molekülü dört oksijen molekülünü taşıyabilir. Akciğer alveollerinden oksijenin bağlanması ve bütün vücuda taşınmasından hem grubu içeren hemoglobin sorumludur (14,21). Yine memeli kas dokusunda oksijen depolayan miyogloblin molekülü de hem içeren oksijen transportunda görev alan metalloenzimdir.

Elektron transferi: Demir atomunun bu özelliği kolay elektron kazanma ve kaybetme yeteneğiyle ilişkilidir. Mitokondride bulunan Fe-S kümelerinde ve solunum kompleksleri 1-4'ün hem gruplarında bulunan demir, zar boyunca hareketli yapıları (ubikinon ve sitokrom c) kullanarak elektronların enerjisinin iletilmesini sağlar. Bu demir-kükürt kümeleri ve hem içeren yapılar hücre solunumunun temelini oluşturur (14).

Oksidatif ve redüktif transformasyon: Bir substratın indirgenmesi veya oksidasyonunu içeren redoks tepkimelerine aracılık eder. Sitokrom P-450 enzimleri aktif bölgesinde hem grubu içerir ve bu gruba örnek olarak verilebilir. Demirin redoks yeteneği reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda işlev yapan katalaz ve peroksidazların aktivitelerinde de etki göstermektedir (14).

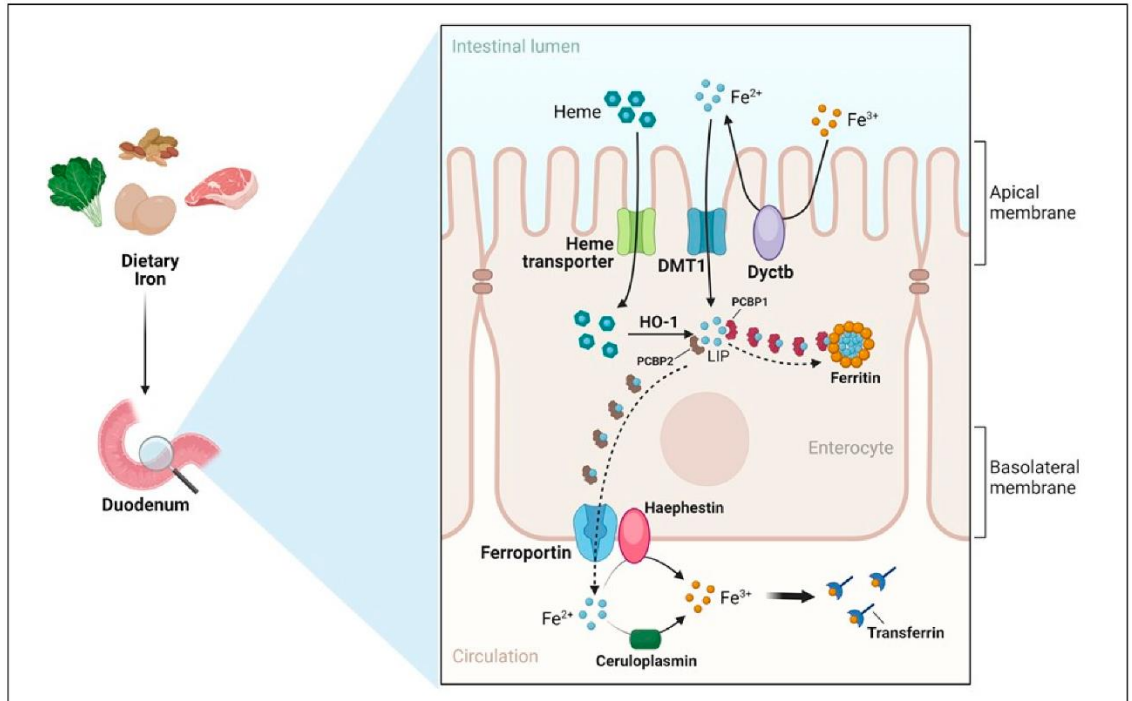
Hidroliz Reaksiyonları: Serin-treonin fosfatazlar demir içeren hidroliz reaksiyonlarında rol alan enzimlerdendir (14).

2.1.1 Demir Emilimi

Besinlerle alınabilen demir hem ve hem olmayan demir olarak ikiye ayrılır. Hayvansal gıdalardan alınan hemoglobin ve miyoglobindeki demir 'hem' formundadır. Demirin bu formu diyetle emilen demirin %10'unu oluşturur ve kolay emilen formdur. Bitkilerden elde edilen demir ise hem olmayan demir formudur. Günlük diyetle alınan demirin, yetişkin erkek bireylerde ve postmenapozal kadınlarda 1-2 mg kadarı ve üreme çağındaki kadınlarda 3 mg'ı bağırsaktan emilir (16,17,22). Demir homeostazisinde en önemli basamak demir emilimidir. Diyetle alınan demirin absorpsiyon basamakları Şekil 1'de gösterilmektedir. Hem içeren demir yüksek oranda emilir, direkt enterosit yüzeyinde bulunan hem taşıyıcı protein 1 (HCP1) reseptörü aracılığıyla pH'dan bağımsız emilim gerçekleşir. Hem demiri emilimini kolaylaştırmak için sitrik asit, askorbik asit, hayvansal dokular gibi faktörlere gerek yoktur (23). Hem içermeyen demirin emilebilmesi için ferröz forma dönüştürülmesi gerekir. Bu dönüşüm asit ortamda olduğundan askorbik asit demir emilimini artırır. Bunun aksine kalsiyum, polifenoller ve fitatlar diyet demiriyle kompleks oluşturarak demir emilimi azaltırlar (24). Demir esas olarak bağırsağın duodenum ve proksimal jejunum kısmından emilir. Fizyolojik pH'da oksitlenmiş halde bulunan ferrik demir, mide asidinin etkisiyle ferreredüktaz duodenal sitokrom B (DCYTB) enzimi tarafından duodenumun proksimalinde ferröz forma dönüştürülür. Ferröz forma indirgenen demir enterositlerin yüzeyindeki divalant metal transporter 1 (DMT-1) ile hücre içine alınır. Non-hem demir alımını sağlayan en önemli protein DMT-1'dir. Vücutta demire ihtiyaç olması halinde enterositin bazolateral membranda bulunan transmembran proteini olan hefastin ile ferröz demir ferrik forma okside edilerek ferroportin aracılığıyla plazmadaki transferrine aktarılır. Demirin dışarı atılım mekanizması vücutta sadece ferroportin ile gerçekleştirilir. Ferroportin miktarı hepsidin seviyeleriyle düzenlenir (24). Hepsidin ferroportine bağlanıp parçalanmasını sağlar. Bu da demirin enterosit dışına atılımını engeller ve demiri ferritin depolarına yönlendirir. Vücutta demirin yüksek olması, oksijen seviyesi, inflamatuvar sitokinler ve peptid yapıda hormonlar gibi düzenleyicilerle hepsidin düzeyi kontrol edilir. Transferrin karaciğerde sentezlenen, ferrik demire yüksek bağlanma afinitesine sahip, glikoprotein yapısında bir proteindir. Enterositlerden ferroportin aracılığıyla hücre dışına atılan ferrik demiri hücrelere taşır. Her bir transferrin molekülü iki tane ferrik demiri güçlü bir şekilde bağlar.

Transferrinin asıl görevi, demirin çözünür hale getirilmesi için şelat oluşturmak, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önlemek ve hücrelere taşınmasını kolaylaştırmaktır.

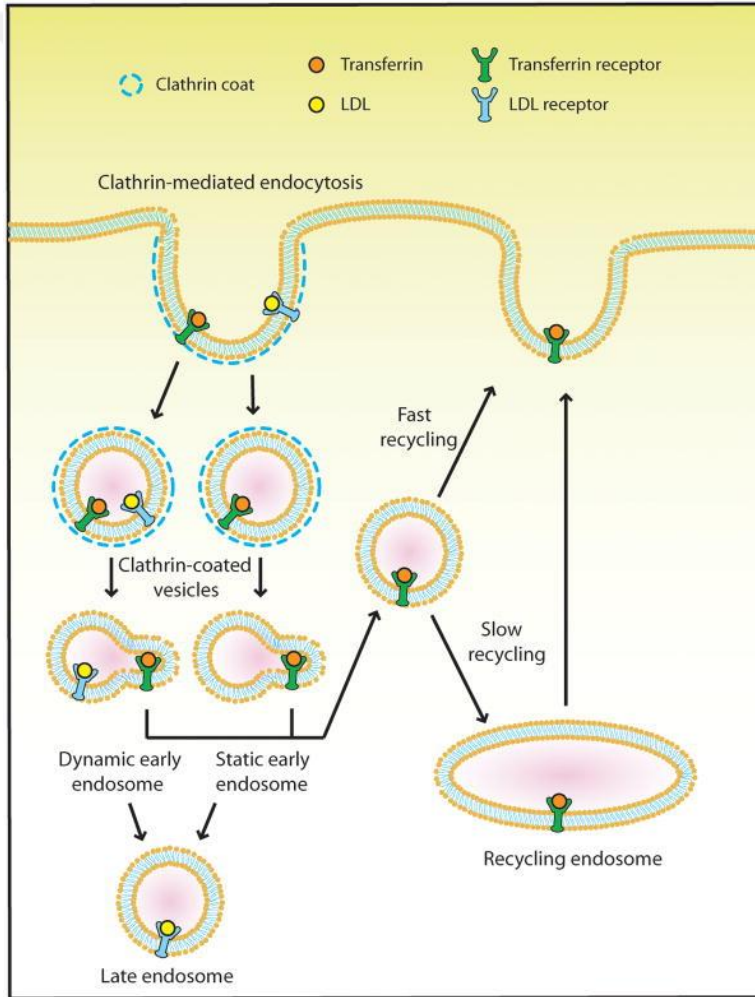
Hücre tipine göre demir alım mekanizmaları da farklıdır. Örneğin makrofajlar fagosite ettikleri yaşlı eritrositlerin hemoglobininin serbestleşen demiri kullanırlar. Aynı zamanda vakuolar membranlarından DMT-1 ile demir transportu yapabilirler. Makrofaj içindeki demir enterositlerde olduğu gibi ferroportin aracılığıyla plazmaya verilebilir ya da ferritin şeklinde depolanabilmektedir. Hepatositler yüzey reseptörleri TfR-1 (hücre yüzeyine yerleşmiş transferrin reseptörü) ve TfR2 (hepatosit, duodenal kript hücreleri, eritroid hücrelerle sınırlı) ile demiri hücre içine alırlar. Bu hücreler dışındaki bütün hücreler yüzeylerinde bulunan transferrin reseptörlerine bağlanan demiri klatriin aracılı endositoz yoluyla holotransferrinden almaktadırlar (Şekil 2) (25). Demir hücre içine girdiğinde sitoplazmada glutatyon gibi bileşiklere gevşek bir şekilde bağlanabilir ve kararsız demir havuzuna katılabilir (26). Bunun dışında ferritin şeklinde depo edilebilir, demir-kükürt kümelerine katılabilir ya da ferroportin tarafından hücreden salınabilir.



Şekil 1: Diyetle alınan demirin intestinal lümeden emilimi (26)

Proton pompası tarafından endosomal pH'ın azaltılması, hem Tf hem de TfR1'de konformasyonel değişiklikler yaparak Fe'nin salınmasını teşvik eder (27). Transferinden sitozole demir taşınmasında önemli bir adım, transferinden demirin salınmasına yardımcı olan endosomun aktif asitleştirilmesidir ve hala TFR1'e bağlı olan apotransferrin, salındığı hücre yüzeyine geri dönüştürülür (28).

Demir, endosomdan çıkar ve DMT1 aracılığıyla hücre sitoplazmasına girer. Prostatın ferriredüktaz altı-transmembran epitel antijeni 3 (STEAP3) de, DMT1 aracılığıyla taşınmadan önce Fe³⁺ ü Fe²⁺ ye indirgeyerek bu süreci kolaylaştırır (29).



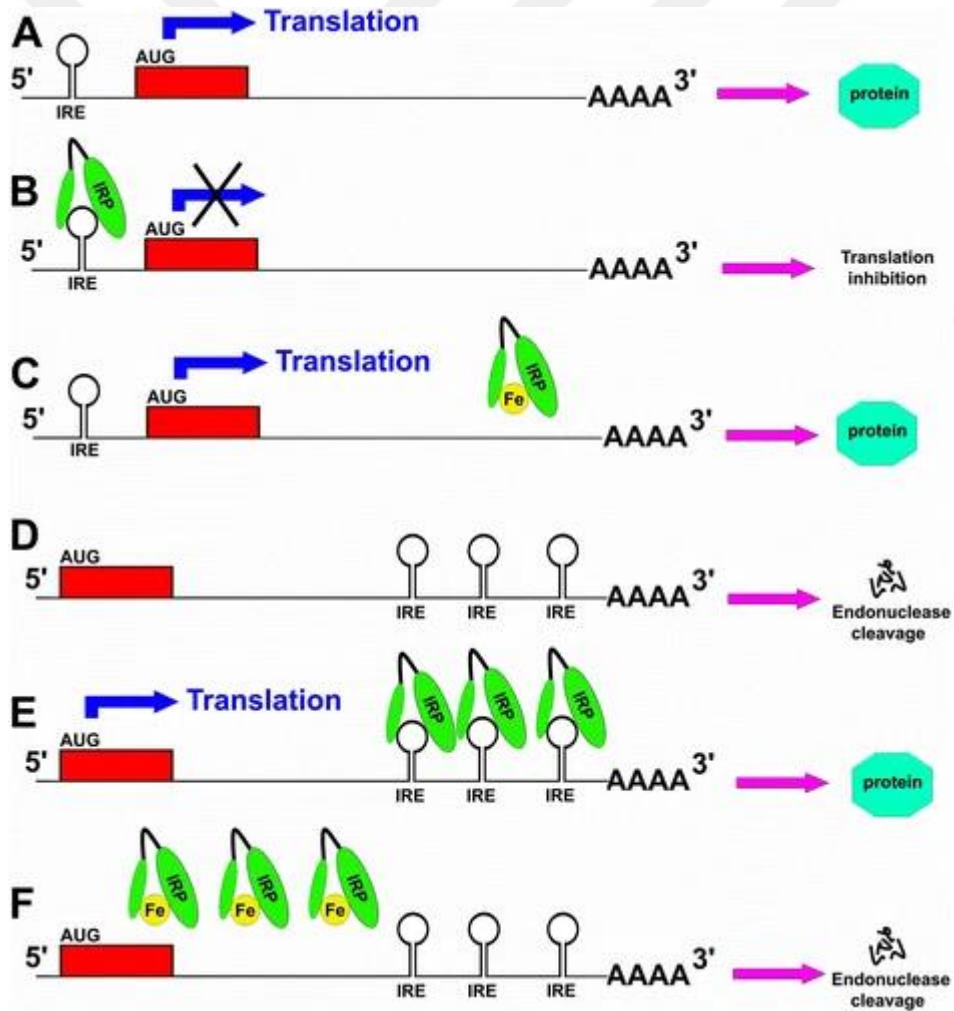
Şekil 2: Transferrinin klattrin aracılı endositozu (25)

2.1.2 IRP-IRE Sinyal Yolu ile Demir Homeostazının Modülasyonu

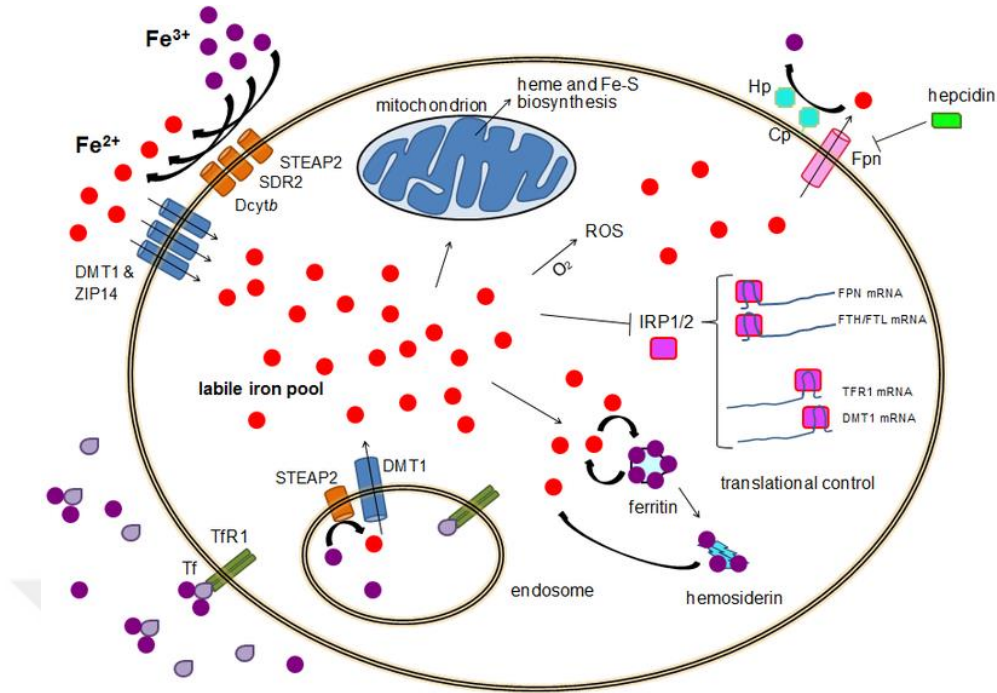
Demir homeostazisi ayrıntılı bir şekilde düzenlenir. Bazı kontrol mekanizmaları transkripsiyonel düzeyde mevcut olsa da, demirin emilimi, taşınması ve depolanması, demir düzenleyici protein (IRP) ve demire duyarlı element (IRE) sinyal yolu tarafından translasyonel düzeyde titizlikle düzenlenir. IRP1 (90 KDa) ve IRP2 (105 KDa) bilinen iki RNA bağlayıcı proteindir ve IRE ile indüklenebilir etkileşimleri, ferritin ve ferroportin (Fpn) mRNA'nın translasyonunu ve TfR mRNA'nın stabilitesini kontrol etme işlevi görür. Kısaca, IRP'ler, mRNA transkriptlerinin çevrilmemiş bölgesi (UTR) içindeki IRE'ler olarak bilinen belirli kodlamayan dizilere bağlanarak demir metabolizmasını kontrol edebilir (30). IRE'ler, CAGUGN dizisini (klasik IRE motifi) içeren 30 nükleotid uzunluğunda RNA motifleridir ve özel sap-ilmek yapıları oluşturabilirler. IRE'ler, hedef mRNA'nın 3'-UTR veya 5'-UTR'sinde bulunabilir. 5'-UTR'lerinde IRE motifleri bulunan transkriptler arasında ferritin H ve L alt birimleri, Fpn ve aminolevulinik asit sentaz bulunur, 3'-UTR'lerinde IRE motifleri bulunan hedef mRNA'da ise TfR (5 kopya) ve DMT-1 bulunur.

IRP'ler translasyonel güçlendirici veya translasyonel inhibitör olarak işlev görebilir. Demir eksikliği olan hücrelerde, IRP ile hedef mRNA'nın 5'-UTR'sindeki IRE motifi arasındaki etkileşim, translasyonun başlatılması için mRNA ile ribozom arasındaki önemli etkileşimlerin kesintiye uğraması yoluyla translasyonu ortadan kaldıracaktır. Ancak, demir açısından zengin hücrelerde, demir konformasyonel bir değişikliği indüklemek için IRP'lere bağlanabilir, bu da IRP'lerin hedef mRNA'dan ayrılmasını teşvik ederek hedef mRNA'nın translasyonunun kolaylaştırılmasına yol açar (Şekil 3). Buna karşılık, bazı mRNA transkriptleri 3'-UTR'lerinde bir veya daha fazla IRE motifi içerir. Demir eksikliği olan hücrelerde, IRP'lerin transkriptlerin 3'-UTR'sindeki bir IRE'ye bağlanması hedef mRNA'yı endonükleaz parçalanmasına karşı koruyabilir. Bu nedenle, IRP'ler ve 3'-UTR IRE arasındaki etkileşim, transkriptlerin yarı ömrünü uzatabilir ve hedef mRNA'nın translasyonunu teşvik edebilir. Bununla birlikte, demir açısından zengin hücrelerde, IRP'nin 3'-UTR'deki bir IRE'den ayrılması, hedef transkriptleri endonükleaz saldırısına ve bozunmasına duyarlı hale getirir ve transkriptlerin translasyonunun aşağı düzenlenmesine yol açar (30). Ferritin ve Fpn'nin her iki transkripti de 5'-UTR'lerinde IRE'ye sahiptir, böylece demir eksikliği koşullarında ferritin ve Fpn'nin translasyonu IRP'ler tarafından inhibe

edilebilir. Ferritin ve Fpn'nin azalmış ekspresyonu, ferritin tarafından gereksiz demir bağlanmasını ve Fpn tarafından demir ihracatını azaltabilir ve bu da hücre kullanımı için mevcut serbest demir seviyesinin artmasına yol açar. Ancak hem TfR hem de DMT1 mRNA, demir eksikliğinde IRP'lere bağlanabilen ve transkriptlerin stabilizasyonuna ve ardından hücrelere demir emilimini teşvik etmek için TfR ve DMT1 sentezinin artmasına yol açabilen 3'-UTR IRE'lerine sahiptir. Bunun aksine, demir birikimi durumunda, artan demir seviyesi, ferritin ve Fpn transkriptlerinin translasyonunu teşvik etmek ve TfR ve DMT1 mRNA'sını dengesizleştirmek için IRP-IRE etkileşimini bozabilir. Bu nedenle demir birikimi altında, demir emilimi inhibe edilirken, demir depolama ve ihracatı artırılabilir. Hücrelerdeki demir homeostazı Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3: IRP-IRE sinyali yolu ile çeviri modülasyonunun mekanizması (30)



Şekil 4: İnsanlarda hücresel demir homeostazını gösteren diyagram (31)

2.1.3 Vücutta Demirin Bağlı Bulunduğu Yerler

Serum albümini birçok metal iyonuna bağlanabilmektedir. Özellikle Zn^{+2} ve Cd^{+2} için özel bağlanma bölgesinin olduğu da bilinmektedir. Bununla birlikte serum albümininin demiri bağlayabildiğine yönelik birkaç yayın olsa da spesifik bir bağlanma yeri olduğu tanımlanamamıştır (17,32–35).

Vücuttaki ana demir depolama proteini ferritindir. Moleküler ağırlığı 474.000 kDa olan ferritin küresel şekilli sitozolik bir proteindir. Ferritin, içi 4500'e kadar Fe^{3+} iyonu depolayabilecek kadar geniş bir protein boşluğuna sahiptir (36). Ferritin iki ana alt birimden oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla 19 kDa veya 21 kDa moleküler ağırlığa sahip hafif (L) veya ağır (H) tiptedir. Ferritin kabuğunun içinde, demir iyonları fosfat ve hidroksit iyonlarıyla birlikte kristalitler oluşturur. Demir, bu protein boşluklarının içinde yarı kristalin birikintiler olarak birikir ve metabolik olarak inaktiftir. Ferritin alt birimlerinin kesişimleri, protein duvarında bulunan iki tip kanal oluşturur. Her iki ferritin kanalı farklı roller üstlenmektedir. Hidrofobik 4 katlı kanal lösin kalıntılarıyla kaplıdır ve 3 katlı kanal hidrofilik glutamat ve aspartat kalıntılarıyla kaplıdır (14).

Hemosiderin başka bir demir depolama protein kompleksidir. Moleküler yapısı iyi tanımlanmamıştır, ancak çözünmeyen bir formda Fe^{3+} oksihidroksit içerdiği düşünülmektedir. Hemosiderin'in redoks aktif bir molekül olduğu bildirilmiştir ve kanıtların çoğu Fe aşırı yüklenme hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Hemosiderin en sık makrofajlarda, lizozomlarda ve siderozomlarda bulunur ve özellikle dokulara kanamadan sonraki durumlarda bol miktarda bulunur. Bozulmuş kırmızı kan hücrelerinden gelen hemoglobin, hemosiderin ve porfirin üreten makrofajlar tarafından yutulduğu hücre içi boşluğa salınır (14).

2.1.4 Karaciğer ve Demir

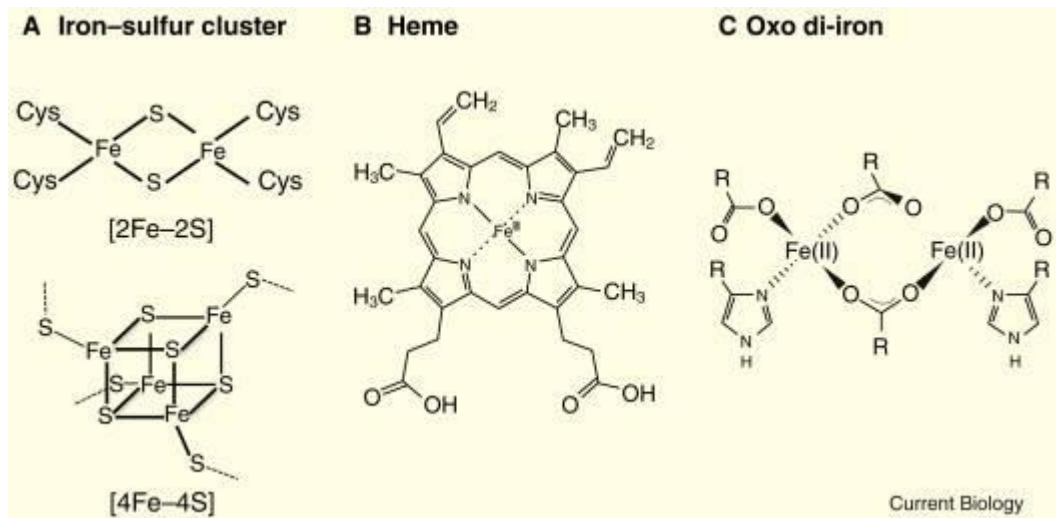
Seruloplazmin, ferroksidaz veya demir(II) oksijen oksidoredüktaz olarak da bilinir. Yapısında 8 bakır atomu bulunur. Genellikle bir bakır taşıma proteini olarak kabul edilse de, birincil işlevi bu değildir. Seruloplazmin, ferröz demir Fe^{2+} 'nin ferrik demir Fe^{3+} 'e oksidasyonunu katalize eder, bu nedenle transferin ile birlikte plazmada taşınmasına yardımcı olur, transferin demiri yalnızca ferrik halde taşıyabilir. Karaciğere giren demirin çoğu plazmadan Tf-TfR kompleksi şeklinde elde edilir. Patolojik durumlarda, transferinle bağlı olmayan demir, ferritin ve hemoglobin/haptoglobin ve hem/hemopeksin kompleksleri organa demir taşınmasında daha büyük önem kazanır.

Hepsidin, sadece ferroportine doğrudan bağlanarak ve onu tıkayarak değil, aynı zamanda ferroportinde ferroportin ubiquitinasyonu, her iki molekülün endositozu ve lizozomal bozunumu ile sonuçlanan konformasyonel bir değişikliği indükleyerek hücrel demir dışı akımını engeller. İn vivo olarak, makrofajlardan, hepatositlerden ve enterositlerden plazmaya demir dışı akımının kaybı, ağırlıklı olarak eritrosit öncülleri tarafından hemoglobin sentezi için plazma demirinin sürekli tüketilmesi nedeniyle hipoferremiye neden olur.

2.1.5 Demir İçeren Proteinler

Demir içeren protein sınıfları: demir-kükürt kümesi içeren proteinler, hem içeren proteinler ve demir-kükürt kümelerinden veya hemden yoksun demir içeren enzimler. Bu proteinlerdeki demir içeren kısımların örnekleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 5).

Demir-kükürt (Fe-S) içeren proteinler, ayrı kimyasal reaksiyonları katalize eden bağımsız enzimler olarak veya elektronları taşıyan komplekslerdeki bileşenler olarak bulunur. Hem'i (demir ve protoporfirin kompleksi) bağlayan proteinler, oksijen bağlanmasında ve oksijen içeren moleküllerin metabolizmasında önemli bir rol oynar. Son olarak, demir, Fe-S veya hem'den bağımsız olarak proteinlere bağlanabilir ve bu proteinler çeşitli metabolik aktivitelerde önemli bir rol oynar. Örneğin, okso di-demir (Fe-O-Fe) enzimleri, çift bağları tanıtmak için moleküler oksijeni kullanan dehidrojenasyon reaksiyonları için yaygın olarak kullanılır. Di-demir merkezi, metan monooksijenaz, ribonükleotid redüktaz ve metil sterol oksidaz dahil olmak üzere çeşitli proteinlerde bulunur. Üç tip demir içeren protein tüm biyolojik alemlerde bulunur, ancak ortamın oksijen gerilimine bağlı olarak, oksijen bazlı metabolizmada yoğun olarak kullanılan hem ve okso di-demir içeren enzimler bulunmayabilir. Örneğin, aerobik olarak büyüyen maya, demir içeren üç tip proteini de ifade ederken, anaerobik olarak büyüyen maya yalnızca demir-kükürt kümesi içeren proteinleri ifade eder (20).



Şekil 5: Demir içeren proteinlerin yapısı (20)

2.1.6 Demir ile İlişkili Parametrelerin Biyokimyasal Ölçümleri

Vücuttaki demir durumunu değerlendirmek için serum numunesinde yapılabilecek tetkikler serum demir, serum ferritin (SF), transferrin saturasyonu ve çözümlenir transferrin reseptörü (sTfR) ölçümüyken, eritrositlerde protoporfirin (EP) düzeyi ölçümü şeklindedir (37). Demir deposunun tahmin edilmesine yönelik yapılan kemik iliği demir boyaması altın standart göstergedir, ancak rutinde kullanımı pratik değildir.

Demir düzeyi hakkında bilgi veren tetkiklerden transferrin saturasyonu transferrinin demir bağlama alanlarının doluluk yüzdesi olarak tanımlanan laboratuvarında hesaplanan bir parametredir. Serum demirinin toplam demir bağlama kapasitesine (TIBC) oranı olarak veya serum demirinin transferrine oranı olarak hesaplanır. Doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ölçülürse, TIBC serum demiri ve UIBC'nin toplamı olarak hesaplanır. Rutinde sıklıkla ölçülen serum demiri öncelikli olarak transferrine bağlı demiri ifade eder. Transferrine bağlı olmayan (NTBI), düşük moleküler ağırlıklı proteinlere veya diğer bileşiklere bağlı demir plazma toplam demir havuzunun %1'inden azını kapsar ve rutinde ölçülmez. EP, eritrositlerde bulunan form olan çinko protoporfirinin (ZPP) doğrudan ölçülen konsantrasyonu veya ekstraksiyondan sonra ölçülen serbest EP konsantrasyonu için kullanılan genel bir terimdir. sTfR, transferin reseptörü 1'in kesilmiş bir parçasıdır ve plazmada transferine bağlı olarak dolaşır (37).

SF, transferin ve sTfR gibi protein bazlı göstergeler immünoassay'lerle ölçülürken, serum demiri, TIBC ve UIBC, demir ile bir renk kompleksi oluşturmak üzere kromojen olarak ferrin veya ferrozin ile kolorimetrik reaksiyon kullanılarak kimya analizörlerinde ölçülür (37).

2.1.7 Demir Durum Göstergelerinin Standardizasyonu

Çoğu demir durum göstergesi için uluslararası referans materyalleri Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü'nden [demir tel formundaki demir (SRM 937) veya demir standart çözeltisi (SRM 3126A) için], Birleşik Krallık Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü aracılığıyla WHO'dan [hemogloblin (IS 98/708), SF (RM 94/572) ve sTfR (RR 07/202) için] veya Avrupa Referans Malzemeleri ve

Ölçümleri Enstitüsü'nden [transferin (ERM-DA470) için] mevcuttur. Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü referans materyalleri, yüksek dereceli referans yöntemlerinin kullanımıyla atanan sertifikalı değerler sağlar (37).

2.1.8 Demir Ölçümü

Kanda demir nötral pH'da transferrine bağlı halde bulunur. Serum demir ölçümü yapabilmek için öncelikle serum asidifiye edilerek transferrine bağlı halde bulunan Fe^{3+} formundaki demir iyonu Fe^{2+} formuna indirgenir. Oluşan demir iyonu batofenantrolin, ferrozin gibi kromojenlerle boyanarak spektrofotometrik ölçüm yapılır.

Serum demir konsantrasyonları atomik absorpsiyon spektroskopisi ile ölçülebilir, ancak bu, hemoliz sonucunda bulunan herhangi bir hem demirin ölçülmesinin dezavantajına sahiptir ve tanı amaçlı kullanılmaz (38).

Demir dokularda temel olarak Prusya Mavisiyle boyanarak tespit edilebilmektedir.

Bilinen bu yöntemlerin dışında demirin bazı formları da araştırma amaçlı olarak ölçülebilmektedir. Araştırmalarda sıklıkla demirin bağlanmayan zararlı olabilecek formu olan serbest/labil formları ölçülmek istenmiştir. Literatür incelendiğinde serbest demir 'reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etme yeteneğini koruyacak şekilde bağlanmış demir' olarak tanımlanırken, labil demir 'düşük afiniteli ligandlara bağlı demir iyonu' olarak açıklanmıştır (4,9,10). Önceki çalışmalar sıklıkla labil plazma demiri olarak adlandırılan transferrine bağlı olmayan plazma demirini ölçmekle birlikte (11,12) eritrosit içi labil demiri kalseinle boyayarak flow sitometri ile analiz etmişlerdir (4,5,9). Yine başka bir çalışmada eritrosit içerisindeki serbest demir HPLC ile ölçülmüştür (13).

2.1.9 Labil Demir Formu

Transferrin, demiri bağlayan plazma proteindir. Transferrinin yaklaşık %70'u demirle doymuştur ve daha fazla miktardaki demir transferrine bağlı olmayan demir şeklinde serumda bulunabilir. NTBI bağlı olmayan bir demir formu olduğu için serbest radikaller üreterek hücre ve dokulara zarar verebilir (39). NTBI sadece talasemi

hastalarında değil diyabet, son dönem böbrek hastalığı, myelodisplastik sendrom gibi hastalıklarda da çalışılmıştır (17,40–44).

2.1.10 Demir ile İlişkili Hastalıklar

2.1.10.1 Demir Eksikliği

Demir içeren yapıların, hemoglobinin ve enzimlerin çalışabilmesi için vücutta belli düzeylerde demir bulunması gerekir. Demir tedariki diyetle alınan besinlerden yapılmaktadır. Yetersiz- düzensiz beslenme, fizyolojik ya da patolojik kanama durumları, demir emilimini azaltan faktörler sonucu vücuttaki demir miktarı azalabilmektedir. Demir eksikliği insanlarda sık görülen rahatsızlıklardan biridir (16,45). Genellikle beslenme yetersizliğine bağlı olarak çocuk ve yaşlı kesimde görülebilmektedir. Bunun yanında yetişkinlerde her zaman kanamayla ilişkilendirilir. Genç kadınlar menstrüel döngüyle demir kaybederken, erkeklerde demir eksikliği tespit edildiğinde kanama durumu araştırılmalıdır (16).

Demir eksikliği anemisinin belirtileri yorgunluk, halsizliktir, ellerde ve göz kapaklarında solukluk gibidir. Demir eksikliğin tanısını koymak için sıklıkla kullanılan biyokimyasal parametreler: serum demiri, demir bağlama kapasitesi, serum ferritini iken hematolojik olarak tam kan sayımı ve periferik yayma kullanılmaktadır. Dolaşımdaki transferin reseptörü, retikülosit Hb konsantrasyonları ve kemik iliğini Prusya mavisi ile boyayıp demirin değerlendirilmesi diğer kullanılacak testlerdir. Kemik iliğinde boyayla demir düzeyinin değerlendirilmesi tanı için en güvenilir testtir. Tedavide ise, dışarıdan verilen demir takviyeleri kullanılır ve gerektiği durumda semptomatik kan transfüzyonu yapılabilmektedir.

Demir eksikliğine neden olan diğer hastalıklardan ailesel demir eksikliği normal hepsidin düzenlenmesi için gereken protein olan matripaz-2'yi kodlayan TMPRSS6 genindeki mutasyonlardan kaynaklanabilir (46,47). Nöroferritinopati demir eksikliğini taklit eden ferritin referans aralığının altında olmasıyla karakterize bir hastalıktır. Demir eksikliğinden farklı olarak bu hastalarda Hb ve serum demir konsantrasyonları tipik olarak normaldir (16,48).

2.1.10.2 Demir Birikimi

Vücutta demir birikimi ya primer hemakromatoz şeklinde ya da inefektif eritropoeze neden olan durumlarda ortaya çıkan anemiyle birlikte demir emiliminin artması ve anemiye tedavi etmek amaçlı sık transfüzyonlar sonucu vücuda alınan demirin artmasıyla sekonder hemakromatoz şeklinde olabilmektedir.

Hemokromatozis ve etkisiz eritropoezle ilişkili bazı anemi tipleri, karaciğeri, kalbi, pankreası ve eklemleri etkileyen artan emilim nedeniyle multisistem demir yüklenmesiyle ilişkilidir. Hepatik polipeptid hepsidinin subnormal veya uygunsuz şekilde düşük etkisi, bu koşullarda oluşan artan demir emilimi ve demir yüklenmesinin merkezinde yer alır (49). Aseruloplazminemi, Friedreich ataksisi gibi diğer kalıtsal bozukluklar da demir birikimiyle giden hastalıklardandır (50–52). Hemosiderozis ve siderozis, doku düzeyinde demir yüklenmesini tanımlamak için en iyi kullanılan terimlerdir. Örnekler arasında kanama veya iltihap bölgelerinde nispeten zararsız demir birikimi ve hemokromatozis veya şiddetli β talasemisi olan bazı kişilerde oluşan kardiyak miyositlerin yaşamı tehdit eden demir yüklenmesi yer alır. Demir yüklenmesi olmaksızın hiperferritinemi; yaygın karaciğer bozuklukları, neoplazmlar, akut veya kronik inflamasyon ve kalıtsal hiperferritinemi katarakt sendromu gibi nedenlerle ortaya çıkabilir.

Hemokromatozis, demirin kaçınılmaz kaybı aşan miktarlarda emilmesi nedeniyle birincil demir yüklenmesine yatkınlığı artıran bir grup kalıtsal bozukluktur. Hemokromatozis nedeniyle şiddetli demir yüklenmesi olan bazı kişilerde, artan cilt demir ve melanin içeriği nedeniyle cildin bronzlaşması, demir kaynaklı hepatosit hasarı nedeniyle siroz ve pankreas β -hücrelerinin ve karaciğer hastalığının demir kaynaklı hasarı nedeniyle diyabetes mellitus "klasik üçlüsü" görülür. Şiddetli demir yüklenmesinin diğer belirtileri arasında kardiyomiyopati, hipogonadotropik hipogonadizm ve karakteristik artropati bulunur. Anemi ve demir kaynaklı nörolojik hasar hemokromatoziste nadirdir. Juvenil hemokromatozis terimi, 30 yaşından küçük çocuklarda, ergenlerde ve yetişkinlerde şiddetli demir yüklenmesi, kalp yetmezliği ve hipogonadotropik hipogonadizm ile karakterize nadir hemokromatozis formlarını tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte, hemokromatozisin belirli tipleri, nedensel mutasyonların tespit edildiği genin adıyla en iyi şekilde tanımlanır.

Ek olarak, anormal demir dağılımının veya demirle ilişkili proteinlerin anormal üretiminin birincil veya ikincil bir rol oynayabileceği birçok kalıtsal bozukluk bilinmektedir. Sonuncular şunları içerir: (1) kalıtsal hiperferritinemi katarakt sendromu(53) (2) aseruloplazminemi,(54–56) (3) GRACILE (büyüme geriliği, aminoasidüri, kolestasis, demir yüklenmesi, laktikasidoz ve erken ölüm) sendromu(57), (4) nöroferritinopati,(50) (5) panto thenate kinazla ilişkili nörodejenerasyon (eskiden Hallervorden-Spatz hastalığı),(58) (6) atranferrinemi, (59,60) ve muhtemelen (7) Parkinsonizm ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar (16).

2.2. Talasemi

Talasemi hastalığının ilk tanımlanması 1932 yılında olmuştur. Akdeniz, Malta ve Sicilya'da tespit edilen anemili hastalara Akdeniz anlamına gelen 'Thalassa' sözcüğünden türetilen 'Thalassaemia' li bireyler denilerek yaygınlaşmış bir söylem halini almıştır. Hastalık ilk olarak bu bölgelerde ortaya çıkmış fakat göç ve köle ticareti ile dünyaya yayılmıştır (61).

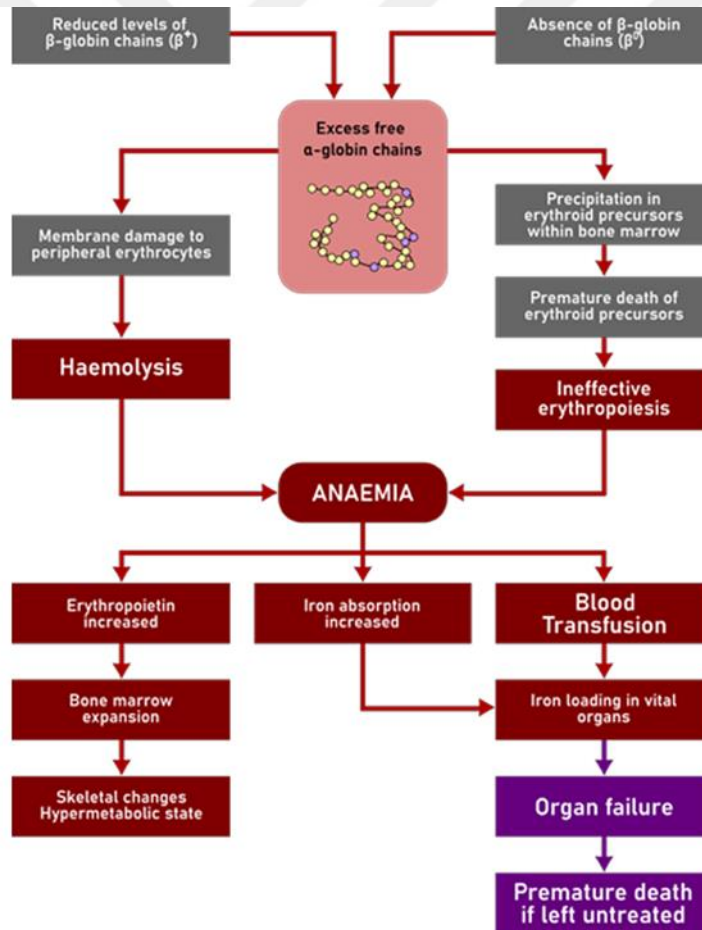
Talasemi bir ya da daha çok hemogloblin zincirinin sentez bozukluğuyla giden otozomal resesif kalıtılan bir grup hastalıktır. İlk dominant kalıtım ise İrlandalı bir ailede tespit edilmiştir (62). Her iki ebeveynin taşıyıcı olduğu durumda her bir gebelikte fetüsün etkilenme olasılığı %25'tir. Talasemiler sentezi bozuk olan globlin zincirine göre farklı isimlerle anılır. Alfa zincir sentez eksikliği varsa alfa talasemi, beta zincir eksikliği varsa beta talasemi adını alır.

Beta talasemi taşıyıcılığının en fazla görüldüğü yerler sıklık sırasına göre Maldivler (%18), Kıbrıs (%14), Sardinya (%10,3) ve Güneydoğu Asya (%3-5)'dir. Alfa talasemi ise Güneydoğu Asya ve Çin'de nüfusun %40'ı oranıyla fazla miktarda görülmektedir, bu bölgelerde HbH hastalığı ve Hb Bart sıklıkla görülmektedir. Türkiye'deki durum ise evlilik öncesi beta talasemi taşıyıcılığının saptanmasına

yönelik testler yapılmasına rağmen ülkemizde yine de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı ve 4.500 kadar talasemi hastası bulunmaktadır (8,63).

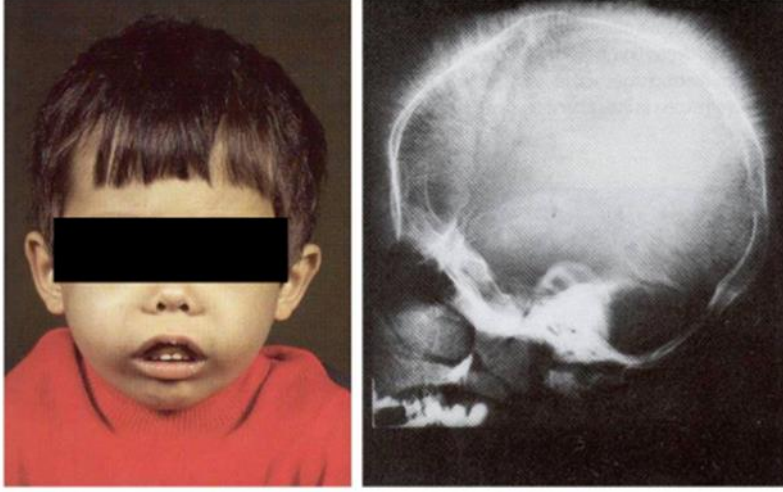
2.2.1 Patogenez

Beta globin zincirlerinin azalmış üretimi veya hiç üretim olmaması durumuna beta talasemi hastalığı denir. Bu durumda alfa zincirlerinin bağ yapacağı beta zincir olmaz ve alfa zincirler birikmeye başlar. Biriken zincirler periferik eritrosit membranında oksidatif hasara ve hemolize neden olur (64,65). Kemik iliğinde eritroid prekürsörlerde biriken alfa zincirler prematür hücre ölümüne ve böylece inefektif eritropoeze ve olgunlaşmamış hücrelerin dolaşıma geçmesiyle dalağın şekil değiştirmiş, kırılabilir özellikteki bu hücreleri yakalayıp dolaşımdan uzaklaştırması da yine anemi gelişimine katkıda bulunur (Şekil 6) (65).



Şekil 6: β talaseminin patogenezini (64)

Vücutta aneminin gelişmesine tepki olarak eritropoetin (EPO) üretimi artar. Artan EPO kemik iliğinde daha fazla eritroid öncüllerin üretilmesine neden olur, ancak eritrosit olgunlaşmasındaki kusur devam ettiği için EPO'nun artışı inefektif eritropoez gelişimine katkıda bulunur (65). EPO'nun artışı eritroid öncülleri üreten kemik iliğinin fazla çalışmasıyla birlikte kemiklerde büyümeye böylece iskelet kusurlarının oluşmasına neden olur (Şekil 7). Buna ek olarak; gelişen anemi vücutta demir emiliminin düzenleyicisi olan hepsidinin üretimini artırır. Artan demir emilimi vücutta demirin birikmesine ve organ hasarlarına neden olur (64,65).



Şekil 7: Talasemi majör hastalarında kemik değişiklikleri (66)

2.2.2 Talasemi Sınıflandırması

2.2.2.1 Alfa-Talasemiler

Alfa globin zincirlerinin azalmış üretimi veya hiç üretim olmaması durumunda ortaya çıkan talasemilerin bir alt grubudur. İnsanlarda 16. kromozomun kısa kolunda alfa globin gen bölgesi bulunur. Alfa talasemide mutasyonlar çoğunlukla delesyon şeklindedir (61). Heterozigot mutasyon durumunda sessizken, homozigot durumda hafif hipokromik anemi görülür. Alfa talasemilerde kronik anemi ve periferik hemoliz patolojik durumu oluşturur (61). Alfa globin zincirinin kaç tanesinin eksik olduğuna göre sınıflandırma yapılır.

Sessiz taşıyıcı ($\alpha\alpha,\alpha^-$): Dört alfa globin zincirinden sadece bir tanesinin silinmesi sessiz taşıyıcılığa neden olur. Tek bir zincirdeki bu kusur tolere edilebilir ve anemiye neden olmaz.

Alfa talasemi taşıyıcılığı ($\alpha\alpha,--$) / (α^-, α^-): Dört alfa globin zincirinden iki tanesinin silinmesiyle oluşan klinik durumdur. Bu hastaların ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) parametreleri genellikle etkilenir.

Hb H hastalığı ($\alpha^-,--$): Üç globin bölgesinde de etkilenme olduğunda ortaya çıkan ve beta tetramerlerinin eritrosit içinde birikerek Heinz cisimciğini oluşturduğu klinik durumdur. Genellikle orta derecede hemolitik anemi, splenomegali gelişir.

Hb Bart's hidrops fetalis ($--,--$): Alfa globin üretiminin hiç olmaması fetal dönemde üretilen gama zincirlerinin alfalarla birleşememesine bağlı olarak kendi içlerinde tetramerler oluşturup birikmelerine neden olur (65). Anne karnında etkilenmenin başladığı, rahim içi transfüzyona ihtiyaç duyulan en ağır alfa talasemi tipidir.

2.2.2.2 Beta Talasemiler

Beta gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlardan bazıları beta zincir üretimine hiç izin vermezken (β^0) bazıları bir miktar üretime izin verir (β^+ , β^{++}) (65). Beta talaseminin klinik sınıflaması:

Sessiz taşıyıcı: Globin zincir sentezinde orta derecede azalma vardır. Hematolojik testleri sıklıkla normaldir.

Talasemi minör (taşıyıcı, heterozigot): Kırmızı hücre dağılım genişliği (RDW)'nin normal olduğu hafif mikrositer aneminin görüldüğü tiptir.

Talasemi intermedia (homozigot): Kliniği beta talasemi majör kadar ağır olmayan sıklıkla transfüzyon gerektirmeyen tiptir. Bazı stres durumlarında enfeksiyon, cerrahi vb. anemi görülebilir. Bu hastalarda da artmış demir emilimiyle birlikte demir birikimi görülebilir.

Talasemi majör (homozigot): Klinik takip gerektiren sık transfüzyon gereksinimi olan, kemik değişikliklerinin ve demir birikim bulgularının görüldüğü en ağır tiptir. Klinik bulgular 6 -24 ay civarı başlar. Beta talasemi majör ve intermedia tedavi ve takip

açısından ayırımının yapılması gereken iki gruptur. Tablo 1’de iki grup arasında ayırt edici özellikler tanımlanmıştır.

Tablo 1: Beta Talasemi majör ve beta talasemi intermediada ayırt edici klinik ve laboratuvar özellikler (8)

	Beta talasemi major	Beta talasemi intermedia
Tanı (yıl)	<2	>2
Hb (g/dl)	<7	8-10
Hepatomegali/splenomegali	Ağır	Hafif-orta
Hb F (%)	>50	>10-50
Hb A2	<4	>4
Ebeveynler	Her ikisinde de Hb A2 yüksek beta talasemi	Biri veya her ikisi atipik taşıyıcı
Mutasyon tipi	Ağır	Hafif/sessiz

2.2.3 Talasemilerin Laboratuvar Tanısı

2.2.3.1 Tarama ve Doğrulama Testleri

Tam kan sayımı, periferik yayma taniya yol gösterecek basit testlerdendir. Tam kan sayımı ile hemoglobin, MCV ve MCH değerlendirilmektedir. Etkilenen hastalarda mikrositoz, hipokromi, anizositoz, poikilositoz periferik yaymada tespit edilen anormalliklerdendir. Bunun yanında hemoglobin türü ve miktarını belirlemek için selüloz asetat elektroforezi, kapiller elektroforez veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılabilir. Demir eksikliği anemisi, kronik hastalık anemisi gibi hastalıklarla talasemilerin ayırıcı tanısında demir, demir bağlama kapasitesi, transferrin ve ferritin gibi biyokimyasal parametreler de yol gösterici olmaktadır.

Beta globin geninde ortaya çıkan mutasyonlar moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA dizi analizi gibi yöntemlerle tespit edilir (61).

2.2.3.2 Prenatal Tanı

Talasemi hastalığıyla baş etmede en kritik aşama hastalığı önlemektir, talasemi önlenabilir bir hastalıktır. Çiftlere evlilik öncesi tarama testleri yapıp aileler olası taşıyıcılık yönünden bilgilendirilebilmektedir. Riskli ailelere genetik danışmanlık verilmekte ve moleküler testler yapılmaktadır. Genetik mutasyonu saptanan aileler çocuk sahibi olmak istediklerinde prenatal danışmanlık verilmekte, fetüsün doğumdan önce amniyosentez, koryosentez ile fetal DNA analizi yapılmaktadır.

Talasemi majörlü hastalara tanı konulduktan sonra komplikasyonların ve tedavi izleminin yapılması gerekmektedir. Tablo 2’de hastalarda tanı anında, aylık, yıllık hangi parametrelere bakılması gerektiği gösterilmektedir.

Tablo 2: Beta Talasemi majörlü hastaların komplikasyon izlem planı (8)

Tanıda	Aylık	3 ayda bir	6 ayda bir	Yıllık	Gerektiğinde
Hepatit belirleyicileri	Tan kan sayımı	Boy, Ağırlık	Kardiak: Tele, EKG	Endokrin: sT4, TSH (>10y)	Hepatik: Karaciğer biyopsisi
HIV	Sistemik muayene	Ferritin	EKO (gerekirse)	OGTT (>10y)	
HBV aşısı	Karaciğer testleri (yüksekse)	Kan şekeri		Kemik yaşı ve kemik dansitesi (>10y)	
Karaciğer testleri		Böbrek, Karaciğer testleri		Puberte değerlendirmesi (>10y)	
Kan grubu (alt gruplar)				FSH, LH, Östrodiol, Testesteron (gerekirse)	
				Kardiak: Tele, EKG, EKO Holter EKG (gerekirse) Kardiyak T2*MRI (>10y)	
				Hepatik: Karaciğer MRI-R2 PZ, aPTZ Hepatit virüs taraması	
				Göz muayenesi	
				Diş muayenesi	
				İşitme testi	

2.2.4 Talasemilerde Tedavi

Ağır anemisi olan özellikle beta talasemi majör grubundaki hastalar tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Tedavileri güncel ve küratif tedaviler olarak ikiye ayırabiliriz.

1. Güncel tedaviler: **eritrosit transfüzyonu, demir şelasyon tedavisi, splenektomi** ve komplikasyonların izlem ve tedavisidir.

2. Küratif tedavi: uzun zamandır tek küratif tedavi seçeneği **kök hücre transplantasyonudur**. Bunun yanında son zamanlarda **gen terapisi** gündeme gelmeye başlamıştır (7).

2.2.4.1 Eritrosit Transfüzyonu

Periferal eritrosit hücrelerinde beta zincir eksikliğiyle birlikte biriken alfa globin zincirlerin neden olduğu membran hasarı ve hemolize, kemik iliğinde inefektif eritropoezin de eklenmesiyle anemi gelişir. İntra-extramedüller eritropoezi baskılamak, hemoglobini belli düzeylerde tutmak ve doku oksijenlenmesini sağlamak için hastalara eritrosit transfüzyonu yapılmalıdır (8,64). Hastanın tekrarlayan transfüzyonların yan etkilerinden en az şekilde etkilenmesini sağlamak aynı zamanda hastalıktan kaynaklanan anemiyi ve buna bağlı değişiklikleri ortadan kaldırmak için yapılacak olan transfüzyonun Tablo 3'teki ilkelere uyması gerekmektedir.

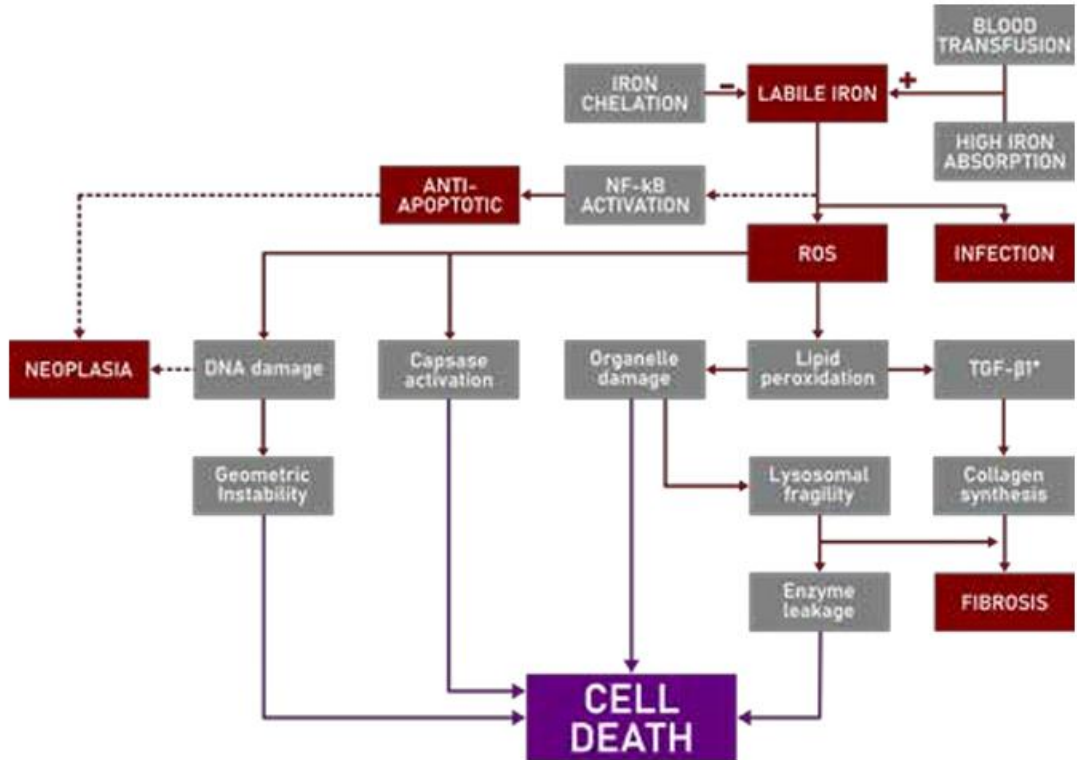
Transfüzyon kriterleri: (8)

- Hemoglobini düşürecek ek faktör olmadan 7g/dl'in altına düştüğünde,
- Hemoglobin seviyesinden bağımsız splenomegali, iskelet anomalileri, büyüme gelişme geriliği olan hastalarda transfüzyona başlanmalıdır.

Beta talasemi majörlü hastalarda hemoglobin düzeyi 9-10 g/dl'nin altına inmeyecek şekilde sıklıkla 3-4 hafta aralıklarla transfüzyon yapılmalıdır. Mümkün olduğunca genç eritrositlerin (7 günden kısa) verilmesi önerilmektedir.

Tablo 3: Beta talasemi majörlü hastalarda eritrosit transfüzyon ilkeleri (8)

Hemoglobin düzeyi	Transfüzyon öncesi 9-10 g/dl olmalı, transfüzyon sonrası Hb 15 g/dl'yi aşmamalıdır
Transfüzyon hızı	4-5 ml/kg/saati geçmemelidir. Özellikle kardiyak sorunu olan hastalarda volüm yükü dikkate alınmalıdır.
Transfüzyon miktarı	10-20 ml/kg
Transfüzyon sıklığı	3-4 hafta aralıklarla
Transfüzyon ürünü	Lökositi azaltılmış (<1x10 ⁶ /ünite) eritrosit süspansiyonu



Şekil 8: Demir yüklenmesinin toksik etkilerine ilişkin mekanizmaların özeti (64)

2.2.4.2 Demir Şelasyon Tedavisi

Talasemide demir birikimine neden olan mekanizmalardan biri anemiye bağlı hepsidinin baskılanması ve artan demir emilimi, ikinci olarak da sık transfüzyonlarla demir alımının artmasıdır. Demir kalp, karaciğer, sinir sistemindeki hücrelerde birikir.

Demir bağlı halde bulunmadığı sürece serbest radikal oluşumuna neden olarak lipid membranlara, organellere, DNA'ya toksik etkilidir (Şekil 8). Normal şartlarda demir transferrine ve ferritine bağlı halde vücutta tutulur, ancak aşırı demir yükünde demir bağlama kapasitesi aşılarak serbest demir ortaya çıkar. Serbest demir şelasyonlarla azaltılmadığı sürece bütün hücelere toksik etkiler göstererek ölümcül sonuçlar doğurabilir (64). Şelasyon tedavisinin amacı serbest radikal oluşuma neden olabilecek demirin vücutta birikiminin önlenmesidir.

Şelasyona başlama kararı düzenli kan transfüzyonunun ilk yılını doldurduğunda ve/veya 12-15 transfüzyon yapıldıktan sonra ve/veya serum ferritini 1000 ng/ml'ye ulaştığında verilmesi önerilmektedir. Serum ferritin takibiyle, karaciğer demir yükü biyopsi veya MR ile belirlenerek, kardiyak demir yükü yine MR ile tespit edilerek demir yükü takibi yapılabilir.

Tablo 4: Şelasyon tedavisinin izlenmesinde serum ferritinin kullanımı (64)

Avantajlar	Dezavantajlar
Tekrar tekrar değerlendirilmesi kolay	Demir yükünün dolaylı tahmini
Ucuz	İnflamasyonla artış
Tekrarlanan örneklerle trend tanımlaması mümkündür	Demir dengesini doğrudan belirleyemez
Uzun vadeli kontrol sonuca bağlı	Yüksek demir yüküne doğrusal olmayan tepki
Demir seviyeleri düştüğünde doz ayarlaması için yararlıdır	Azalmanın olmaması tepkiyi dışlamaz
Mutasyon Analizi	Demir yüküyle ilişkisi şelatlayıcıya göre değişir
	LIC ile ilişki farklı hastalıklarda farklılık gösterir

LIC, liver iron concentration

Serum ferritini: En az 3 ayda bir ölçülür ve hedef 500-1000 ng/dl arasında tutulmaya çalışılır. Ancak ferritin demir yükünü indirekt olarak gösterir, bunun yanında akut faz reaktanı olduğu için inflamatuvar-enfeksiyöz durumlardan etkilenir. Serum ferritin ölçümü direkt olarak tedaviye cevabı veremez. Serum ferritinin şelasyon izleminde kullanılmasındaki avantaj ve dezavantajları Tablo 4’de özetlenmektedir.

Karaciğer demir yükü ölçümü: Tüm hastaların her yıl bir defa veya karaciğer demir konsantrasyonu >15 mg/g ise altı ayda bir, R2 veya T2 sekanslarında MRI kullanılarak demir birikimi indirekt olarak ölçülebilir (67). Superconducting quantum interference device (SQUID) kullanılarak da karaciğer demir yükü non-invaziv direkt olarak ölçülebilir. Ancak bu yöntem uygulanması zor ve pahalı bir tekniktir. Demir

birikiminin tespitinde altın standart yöntem karaciğer biyopsisidir. Ancak invaziv bir işlem olması ve uygulamasının tecrübe gerektirip zor bir işlem olması nedeniyle pratikte önerilmemektedir, genelde transplant öncesi hastalarda veya siroz değerlendirmesi gibi durumlarda yapılmaktadır (8,67). Talasemi hastalarında demir birikimini gösteren iki teknik arasında avantaj ve dezavantajlar Tablo 5’de listelenmektedir.

Kardiyak demir yükü ölçümü: Kalpteki demir birikimi göstermek için kullanılan T2 sekanslı MR kardiyak demir yükünü gösteren altın standart yöntemdir (67).

Tablo 5: MRG ve biyopsi ile karaciğer demir konsantrasyon tespitinin gerekçesi, avantajları ve dezavantajları (64)

Avantajlar	Dezavantajlar
Vücut demirinin en güvenilir tahminini verir	Pahalı (biyopsi veya MRI ile)
Demir dengesinin (LIC değişimi) hesaplanmasına olanak sağlar	SF kadar sık tekrarlanamaz (MRI ile maliyet veya biyopsi ile rahatsızlık)
Uzun vadeli LIC kontrolü prognoza bağlı	Şelatlı hastalarda LIC kardiyak demirin öngörücüsü olarak güvenilir değildir
LIC inflamasyondan etkilenmez (SF'nin aksine)	biyopsi komplikasyon riskleri (uzman merkezlerde düşük)
Biyopsi karaciğer hasarının derecesini gösterir	örnekleme artefaktından etkilenen biyopsi yöntemi
MRI non-invaziv ve iyi hasta kabulü	MRI yöntemi evrensel olarak mevcut değildir
MRI yöntemi farklı merkezlerde gerçekten kurulabilir ve standartlaştırılabilir	MRI yöntemi harici doğrulama gerektirir 30 mg/g kuru ağırlık LIC'nin üstünde MRI tespiti güvenilir değildir

LIC, liver iron concentration; MRI, magnetic resonance imaging; SF, serum ferritin

Demir şelatörlerinin tasarımı klasik olarak, demir birikiminin ana bölgelerine etki ederek ve böylece plazma ve interstisyel sıvıdaki metal seviyelerini dolaylı olarak azaltarak vücuttaki demir yükünü azaltmayı amaçlayan ajanlara odaklanmıştır. Bu tasarıma uyan ajanlar, her ikisi de doğrudan karaciğer demirine etki eden ve onu safra yoluyla dışarı atan desferrioksamin (DFO) ve ICL670 ile görünüşe göre karaciğerden demir çıkaran ancak idrar yoluyla salgılanmak üzere plazmaya taşıyan deferiprondur (tek başına veya DFO ile birlikte kullanılır). Ancak, DFO ve deferipron gibi şelatörlerin labil plazma demirini (LPI)'yi azaltabileceği diğer yol, LPI'nin doğrudan yakalanması ve böylece demir aşırı yüklenmiş hastaların organlarına (kalp gibi) demir girişinin önlenmesidir. Böyle bir strateji için, günün çoğu saatinde plazma şelasyon aktivitesinin sabit bazal seviyesini korumaya ihtiyaç duyulabilir. Üçüncü bir şelatör etki modu, şelatörün kalp veya pankreas gibi ekstrahepatik dokulara nüfuz etme ve böylece biriken demirle ilişkili sitotoksik aktiviteyi nötralize etme yeteneğine dayanır. Deferipron ve ICL670 görünüşe göre bu kategoriye uyuyor, ancak şelatların hücrelerden çıkma kapasitesi muhtemelen iki ajan arasında önemli ölçüde farklılık gösteriyor. Aynı ilaçlara veya bunların kombinasyonuna dayalı olsun, üç şelasyon modunu gösteren ajanlar veya rejimlerle en iyi sonuçların elde edilmesi bekleniyor.

Şelasyon tedavisi için birden çok yaklaşım kullanılmaktadır (7,67).

Koruyucu tedavi: Kan transfüzyonlarıyla alınan demir düzeyinin sık ve yakın takiplerle kontrol altında tutularak toksik düzeylere ulaşmadan tedavisinin yapıp dengeli bir seviyeye gelmesi amaçlanmaktadır.

Kurtarma tedavisi: Toksik düzeylere ulaşan demirin hızla vücuttan uzaklaştırılma yaklaşımıdır. İkili şelatör tedavileriyle kurtarma tedavisi yapılabilir.

Acil tedavi: Yoğun şelasyonla demir atılımının sağlanması gereken, demir yüküne bağlı kardiyak yetmezlik gelişen hastalarda uygulanan tedavidir.

Tedavide doz ayarlaması vücut demiri takip edilerek yapılır. Aşırı ve/veya yetersiz şelasyondan kaçınılmalıdır (7). Aşırı şelasyon tedavisi şelatörün yan etkilerine maruziyeti artırır. Demir şelatörleri kararsız demir havuzundaki demirle daha hızlı etkileşime girer ve depolanan demirlere göre dolaşımdan daha hızlı uzaklaştırır (64).

Ülkemizde demir şelatörü olarak sık kullanılan ilaçların özellikleri Tablo 6’da gösterilmektedir. Bütün şelatörler için de takipte ferritin düzeyleri önemlidir. Serum ferritini 1000 µg/L altına düşürünce doz azaltılmalı, 500 µg/L altına düşerse çok düşük doz kullanılmalı veya kesilmelidir. Kalpte demir birikimi fazla olan hastalarda en etkin tedavi deferiprondur (67).



Tablo 6: Beta talasemi tedavisinde kullanılan demir şelatörlerinin karşılaştırılması (8)

	DFO	DFP	DFX
Doz	25-60 mg/kg/gün	75-100 mg/kg/gün	20-40 mg/kg/gün
Yaş	>2 yaş	>2 yaş (6 yaş altında deneyim sınırlı)	>2 yaş
Uygulama	PE (SK, İV) 8-12 saat, 5- 7 g/hafta	Oral (tablet- süsp.) 3 dozda	Oral (suda çözünen tablet) tek dozda
Yarılanma ömrü	20-30 dk	3-4 saat	8-16 saat
Atılım	İdrar-Dışkı	İdrar	Dışkı
Yan etki	Lokal reaksiyonlar, oftalmolojik, işitsel, büyümede gecikme, alerjik	Gastrointestinal bozukluklar, agranülositoz /nötropeni, artralji	Gastrointestinal bozukluklar, döküntü, hafif ilerleyici olmayan kreatinin artışı, oftalmolojik, işitsel
Maliyet	Yüksek	Düşük	Düşük
İzlem	Yılda bir kez işitsel ve görsel ölçüm	Haftalık tam kan sayımı ve aylık ALT ölçümü	Ayda bir kez serum kreatinin, ALT, Total, direkt bilirubin ve hemogram tayini
Lisans	FDA+	FDA-	FDA+

ALT; alanin aminotransferaz, İV; intravenöz, SK; subkutan, DFO; desferrioksamin, DFP; Deferipron, DFX; deferasiroks

2.2.4.3 Splenektomi

Transfüzyona bağımlı olmayan talasemi hastalarında periferel eritrositlerde biriken globin zincirlerinin membranda hasar oluşturması üzerine şekil bozukluğu olan eritrositlerin dalakta tutulup imha edilmesi dalağın fazla çalışması ve büyümesine neden olur. Transfüzyona bağımlı olmayan talasemide splenektomiye daha sık ihtiyaç duyulur. Transfüzyona bağımlı talasemililerde dalakta artmış eritrosit yıkımını önlemek ve transfüzyon ihtiyacını azaltarak demir birikimini önlemek amacıyla splenektomi yapılır. Ancak transfüzyona bağımlı talasemi hastalarında güncel transfüzyon rejimlerine uyum sağlandığı takdirde dalağın büyümesi engellenmiş olur böylece splenektomiye nadiren gerek duyulur (67).

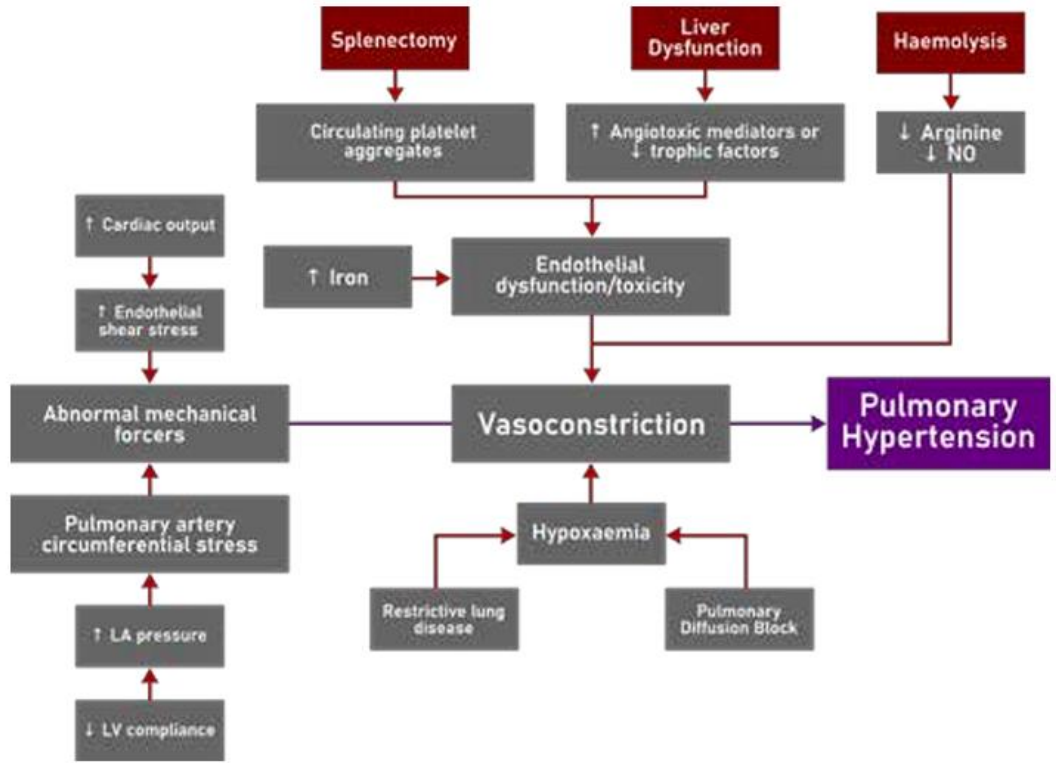
Ulusal ve uluslararası kılavuzlarda ciddi komplikasyonların gelişme riskiden dolayı splenektomi rutin bir prosedür değil çok gerekli olduğu birkaç endikasyon durumunda yapılan bir uygulamadır (64,67). Splenektominin endike olduğu durumlar: 200-275 ml/kg/yıl üzerinde çıkan kan gereksinimi, hipersplenizmi gösteren sitopeniler, semptomatik splenomegali. Splenektomi sonrası hastalar gelişebilecek komplikasyonlar yönünden izlem altında olmalıdır.

2.2.4.4 Kök Hücre Transplantasyonu

Halen etkinliği kanıtlanmış tek küratif tedavi seçeneğidir (8,64). Kök hücre naklinde en iyi sonuç talaseminin erken döneminde henüz demir birikimine bağlı organ hasarı başlamadan yapılmasıdır (8).

2.2.4.5 Gen Terapisi

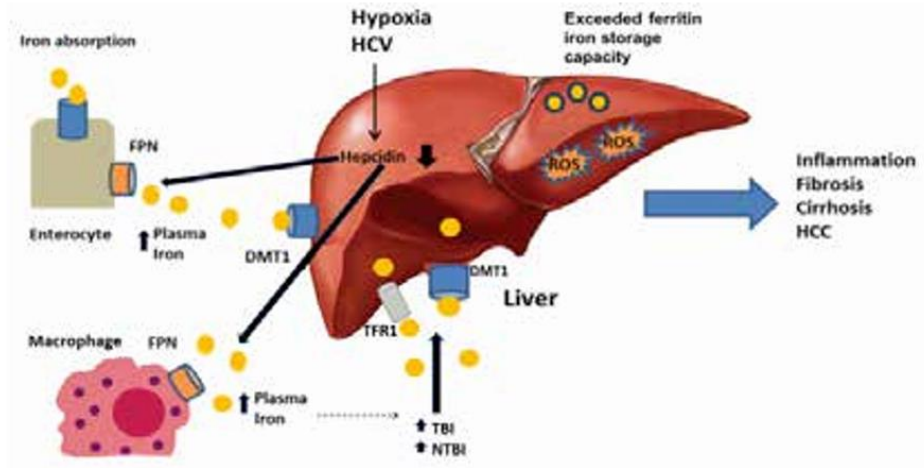
Hematopoetik kök hücre genomu manipüle edilerek mutasyona uğramış genlerin yetersiz veya hatalı işlevini telafi etmeyi amaçlamaktadır (64). Kök hücre naklinin sadece iyi uyumlu donöre sahip genç hastalarla sınırlı olması ve nakille ilişkili komplikasyonları önlemek ve tedavi etmek için uzun süren immun baskılama gerekliliği uygulanmasını kısıtlamaktadır. Tedavi edici genin sağlıklı bir kopyasının viral vektörler kullanılarak hücrelere yerleştirilmesi yoluyla gen eklenmesi ya da hastalık yapan geni yerinde onaran veya yönlendirilmiş bir mutasyon yoluyla gen düzenlemesi yapmak gen terapisinin uygulama alanlarıdır (64).



Şekil 10: Talasemi hastalarında pulmoner hipertansiyona neden olan mekanizma (64)

2.2.5.2 Karaciğer

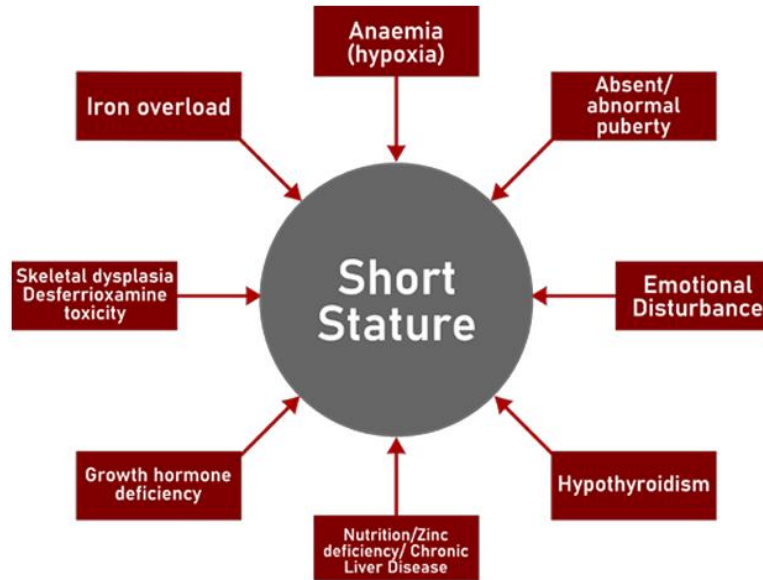
Sık transfüzyonlarla vücuda giren fazla miktardaki demir önce makrofajlarda daha sonra hepatositlerde birikir. İnefektif eritropoezin neden olduğu EPO salgısı böbrekle birlikte karaciğerde gerçekleştirilir. EPO üretimi hepsidinin baskılanmasına böylece demirin daha fazla emilimine katkı sağlar. Aşılan demir depoları plazmada transferrine bağlı olmayan demirin ortaya çıkmasına neden olur. Bu serbest demir reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkı sağlayarak karaciğer hücrelerinde inflamasyon, nekroz, fibroza yol açar (Şekil 11).



Şekil 11: Talasemi hastalarında demir birikiminin karaciğere etkileri (64)

2.2.5.3 Büyüme-Gelişme

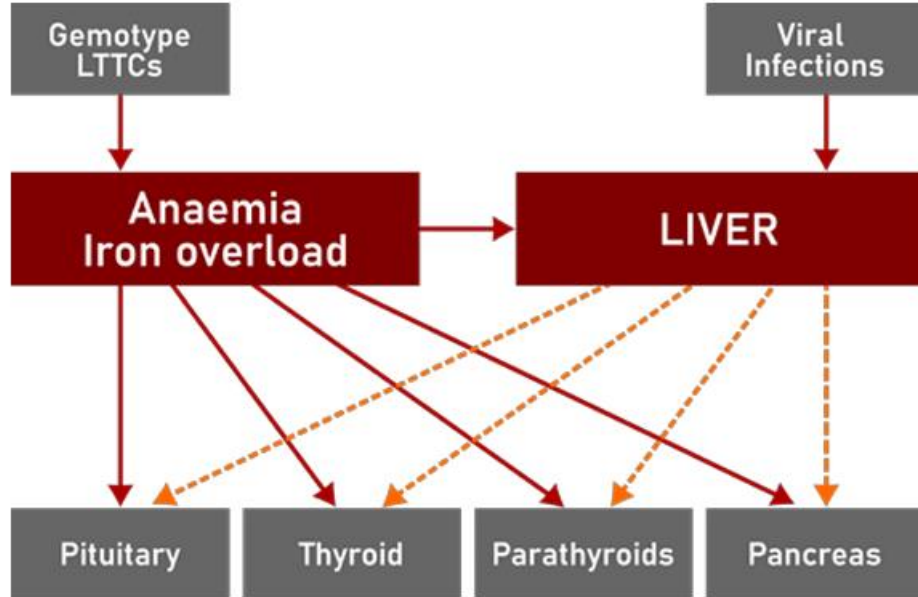
Talasemi hastalarında kronik anemi, şelasyon tedavisinin toksik etkileri ve vücutta biriken demirin toksik etkileri büyüme-gelişmeyi etkileyen faktörlerdir. Bunun dışında endokrin organların da hastalık nedeniyle etkilenmesiyle hipotiroidi, büyüme hormonu eksikliği, çinko eksikliği, kronik karaciğer hastalığı ve psikososyal stres de katkıda bulunur (Şekil 12).



Şekil 12: Talasemi hastalarında büyüme-gelişmeyi etkileyen kısa boya sebep olan faktörler (64)

2.2.5.4 Endokrin Sistem

Demir yüküyle ilişkili olarak gecikmiş puberte, hipogonadizm, hipotiroidizm, diabetes mellitus gelişebilir (Şekil 13). Adrenal yetmezlik nadir gelişir. Hastalara tanıyla birlikte ve sonrasında 3 aylık aralıklarla boy, kilo, pubertal gelişim, tiroid fonksiyon testleri değerlendirilmelidir.



Şekil 13: Talasemi hastalarında endokrin sistem komplikasyonlarının etyopatogenezi (64)

2.2.5.5 Kemik-İskelet Sistemi

Kemik oluşumunun azalması ve yıkımının artması dengesiz bir kemik dönüşümüne ve kemik kırılabilirliğinin artmasına neden olur. Bunun yanında kemik iliğindeki etkisiz eritropoez kemiklerin genişlemesine ve şekil bozukluğuna neden olur. Demir birikiminin kemikteki direkt etkisi osteoid olgunlaşması üzerinedir. Osteoid mineralizasyonunu engeller. Hastalığın yaptığı kemik deformasyonlarına ek olarak demir şelatörlerinin de kemik-iskelet sistemine yan etkileri vardır. Bu ajanlar osteoblast üretimini engeller ve apoptozunu destekler. Özellikle desferoksamin kısa boy ve uzun kemiklerde displazik değişikliklere neden olabilir.



3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1 GEREKLİ MATERYALLER

3.1.1 Kimyasallar ve Kullanılan Diğer Malzemeler

K2 EDTA'lı tüp (3 ml)

Jelli biyokimya tüpü (5ml)

200 ul ve 1000 ul pipet ucu

Ependorf

Sodyum klorid

Distile su

Kloroform

Etanol

Askorbik asit

Asetik asit

Sodyum asetat-3-hidrat

Ferrozin (Sigma–Aldrich 82950, monosodium 3-(2-pyridyl) 5,6-bis(4-phenylsulphonic acid)-1,2,4-triazine)

Ammonium iron (II) sulfat hexahydrate

3.1.2 Cihazlar

Vortex (Termolyne Maxi Mix II)

Santrifüj cihazı (Hettich EBA -12R)

Santrifüj cihazı (Hettich Universal 320)

- 80 °C derin dondurucu

-20 °C derin dondurucu

Otomatik pipet (Socorex/ Acura 825)

Distile su cihazı (Elga/Purelab Optionq-DV25)

pH metre (Hanna)

Siemens Advia 1800

Siemens Advia 2120i

Siemens Atellica-4 IM/CH-HOR-1-2

Siemens Atellica-5 IM/CH-HOR-1-2

Atellica-5 IM/CH-BIO-1-2,

Chemistry XPT1

3.2 Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Çalışmamızda 70 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu ve 70 β -talasemi majör hastasını içeren talasemi hasta grubu olmak üzere iki grup bulunmaktadır. Grup sayıları G-Power programı ile etki büyüklüğü 0,6 hata payı 0,05 ve %95 güven aralığı referans alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya katılımcılar; Kasım-Aralık 2024 tarihleri arasında Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Pediatri polikliniğine başvuran 10-35 yaş arası beta talasemi majör hastalığına sahip kişiler arasından seçilmiştir. Kontrol grubuna Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Aile Hekimliği polikliniğine 10-35 yaş arası genel muayeneye gelen sağlıklı kişiler dahil edilmiştir. Çalışma prospektif kesitsel bir araştırmadır. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm katılımcılara ve velilerine çalışmayı anlatan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu verilip okutulmuş ve imzalı onayları alınmıştır. Çalışma protokolü Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 1 no'lu Tıbbi Araştırmalar Bilimsel ve Etik Değerlendirme Kurulu'ndan geçmiş ve tüm hastalardan bilgilendirilmiş yazılı onam alınmıştır (TABED 1-24-642).

3.2.1. β -Talasemi Majör Hasta Grubu

Beta talasemi tanı ve tedavi kılavuzlarına uygun olarak tam kan sayımı, periferik yayma, hemoglobin elektroforezi ve/veya genetik testler sonucu beta talasemi majör tanısı almış olan 10-35 yaş arası hastalardan oluşturuldu. Hastaların tamamı düzenli kan transfüzyonu almaktadır. Talasemi hasta grubunda bulunan 70 hastadan 23

tanesinin kan örneği transfüzyondan hemen sonra alındığı için bu hastalar çalışmadan dışlanmıştır. Böylece çalışmaya dahil edilen talasemi hastaları 47 bireyden oluşmaktadır. Hastalardan 37 tanesi şelasyon amaçlı ilaç tedavisi alırken 10 tanesi herhangi bir ilaç kullanmamaktadır. Şelasyon amaçlı ilaç kullanan hastalardan 27 tanesi deferasiroks, 2 tanesi deferipron, 8 tanesi de hem deferasiroks hem deferipron tedavisi almaktadır. Hastaların kan örnekleri son yapılan transfüzyon işleminden en az 3 hafta geçtikten sonra alınmıştır.

Çalışmadaki Dışlama Kriterleri

1. Transfüzyon işleminden hemen sonra alınmış olan numuneler
2. Talasemi intermedia hastaları
3. Laboratuvara ulaşan tam kan sayımı numunesinin yetersiz olan bireyler
4. Yeni geçirilmiş enfeksiyon bulgusu veya aktif enfeksiyonu olan bireyler

3.2.2. Kontrol Grubu

Kontrol grubu, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Aile Hekimliği polikliniğine genel muayene için başvuran, kronik hastalığı ve düzenli ilaç kullanımını olmayan, serum demir, serum ferritin ve hemoglobini referans aralık içinde bulunan 10-35 yaş arası bireylerden oluşturuldu. Çalışmaya katılan 70 sağlıklı bireyden 17 tanesinin numune miktarının yetersiz olmasından dolayı çalışmadan çıkarılmıştır. Böylece sağlıklı kontrol grubunda 53 birey çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadaki Dışlama Kriterleri

1. Serum ferritin, serum demir ve hemoglobin düzeyleri referans aralık dışında olan bireyler
2. Mevcut ek hastalığı, yeni geçirilmiş enfeksiyon bulgusu veya aktif enfeksiyonu olan bireyler
3. Laboratuvara ulaşan tam kan sayımı numunesi yetersiz olan bireyler

3.3 Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Pediatri ve Aile Hekimliği kliniklerine başvuran katılımcılardan rutin analizleri için alınan Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li tam kan ve sarı kapaklı tüpe alınan biyokimya-hormon kanları laboratuvara ulaştığında

belirlenen katılımcıların örnekleri seçilmiş ve tam kan numunelerine ön işlemler yapılmıştır. Talasemi grubunda yer alan katılımcıların rutin izlemlerinde vücutta biriken demir düzeyini belirlemek ve transfüzyon ihtiyacına karar vermek için serum ferritin istemi ve anemi düzeyini değerlendirmek için tam kan sayımı istemi yapılmaktadır. Hem talasemi grubundakiler hem de sağlıklı gönüllülerin rutin istemlerinde yer alan tam kan sayımı için mor kapaklı tüpe alınan numuneler seçilerek ön işlemler yapılmıştır. Ön işlemler sonrasında numuneler analize kadar -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4 Rutin Tetkiklerde Yapılan Analizler

Talasemi hastalarının aylık rutin kontrollerinde yapılan tam kan sayımı ile hemoglobin düzeyi, üç ayda bir yapılan tetkiklerinde ferritin düzeyi değerlendirilmektedir. Sağlıklı gönüllülerde yine tam kan sayımı, demir, ferritin parametreleri istenen örneklerden çalışılmıştır. Bu analizlerin tamamı Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Merkez Laboratuvarında Siemens firması kitleri ile otomatik analizörlerle yapılmıştır.

Katılımcıların mor kapaklı tüpe alınan tam kan sayımı (CBC) numunelerinden eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC ve RDW parametreleri çalışılmıştır.

- Tam kan sayımı (CBC) Siemens Advia 2120i (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA) eritrosit ve MCV optik laser scatter yöntemi analiz edilir. Hemoglobin siyanür içermeyen ölçüm methodu ile spektrofotometrik olarak ölçülürken RDW eritrosit histogramlarından elde edilir. Hematokrit, MCH ve MCHC parametreleri ise hesaplanan parametrelerdir.
- Serum demiri Siemens Advia 1800 (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA), Atellica-5 IM/CH-BIO-1 (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA), Atellica-5 IM/CH-BIO-2 (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA), Chemistry XPT1 (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA) otomatik analizörleriyle kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür.
- Serum ferritini; Siemens Atellica-4 IM/CH-HOR-1-2 (Siemens Healthcare, Tarrytown, USA), Siemens Atellica-5 IM/CH-HOR-1-2 (Siemens Healthcare,

Tarrytown, USA) otomatik analizörleri ile kemilüminometrik iki bölgeli sandviç immunoassay ile ölçülmüştür.

3.5 Analiz Öncesi Yapılan Ön İşlemler

EDTA'lı tüpe alınan tam kan numunesi 1.500 g'de 10 dk santrifüj edilerek plazma kısmı atıldı ve atılan kısma eşit miktarda serum fizyolojik (%0,9 NaCl) eklenerek üç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son yıkamanın ardından atılan süpernatant kısmının yerine eşit miktarda distile su eklenerek -20 °C derin dondurucuda 2 saat bekletilerek eritrositlerin tamamen lizise uğraması ve hemolizat eldesi sağlandı. Hemolizat eldesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Değerlendirme Protokolü 7 (EP7) (68) esas alınarak hazırlandı.

3.6 Eritrosit İçi Non-Hem Demir Ölçümü

Hemolizat eldesinin ardından yapılan ölçüm prosedürü iki aşamadan oluşmaktadır.

1. Hemolizat içerisindeki hem grubunu içeren proteinlerinin uzaklaştırılması
2. Hemoglobine bağlı olmayan (non-hem) demir ölçümünün gerçekleştirilmesi

Hemolizattan 500 µl alındı, üzerine 300 µl kloroform ve sonrasında 500 µl etanol ependorfa eklendi. Elde edilen bu karışım vortekslenip ardından 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda hemolizat içerisindeki hemoproteinler (hemoglobin vb.) çöktürüldü (69). Numunenin üst kısmındaki süpernatant, non-hem demir düzeyinin ölçülmesi amacıyla ayrıldı ve -80 °C derin dondurucuda analize kadar saklandı.

Serum demir ölçümü için kullandığımız geleneksel yöntem ferrozin bazlı kolorimetrik ölçüm esasına dayanır. Numunede bulunan hemoglobine bağlı olmayan ferrik iyon sodyum askorbatın bulunduğu ortamda ferröz forma indirgenir. Daha sonra 571/658 nm'de absorbe edilen renkli bir kromofor oluşturmak için ferrozinle birleştirilir (70–73). Otomatik analizörde eritrosit içinde hemoglobine bağlı olmayan demir miktarı ölçüldü ve bu parametre katılımcılar arasında standardizasyon sağlanması açısından katılımcıların hemoglobinlerine oranlanarak sonuç verildi.

Bu çalışmada ferrozinin bazlı kolorimetrik serum demir ölçüm yönteminde minör modifikasyonlar yapılarak eritrosit içi non-hem demir ölçümü gerçekleştirildi. Geleneksel olarak demir ölçümü için kullanılan valide ve verifiye edilmiş kitle çalışılmıştır.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

Araştırılan parametrelerin dağılımının normalliği Shapiro-Wilk/Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. Kategorik değişkenler yüzde ve frekans olarak, normal dağılıma sahip sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma olarak ve normal dağılıma sahip olmayan değişkenler medyan ve min-max değerleri olarak sunuldu.

Normal dağılıma sahip nicel değişkenleri karşılaştırmak için bağımsız örneklem T testi kullanılırken, normal dağılıma sahip olmayan verileri karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin normal dağılıma uyan parametrelerle ilişkisini değerlendirmek için Pearson korelasyon analizi, normal dağılıma uygun olmayan parametrelerle ilişkisini değerlendirmek için Spearman korelasyon analizi yapıldı. Tüm tahminler için 0,05'ten küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel hesaplamalar için SPSS yazılımı Ver. 22.0 kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD).

4. BULGULAR

4.1 Geleneksel Demir Ölçüm Yöntemine Uygulanan Minör Modifikasyonlar

Rutin serum demir ölçümlerinden daha düşük düzeylerde demiri ölçebilmek için modifikasyonlar yapıldı.

4.1.1 Aplikasyonda Yapılan Değişiklik

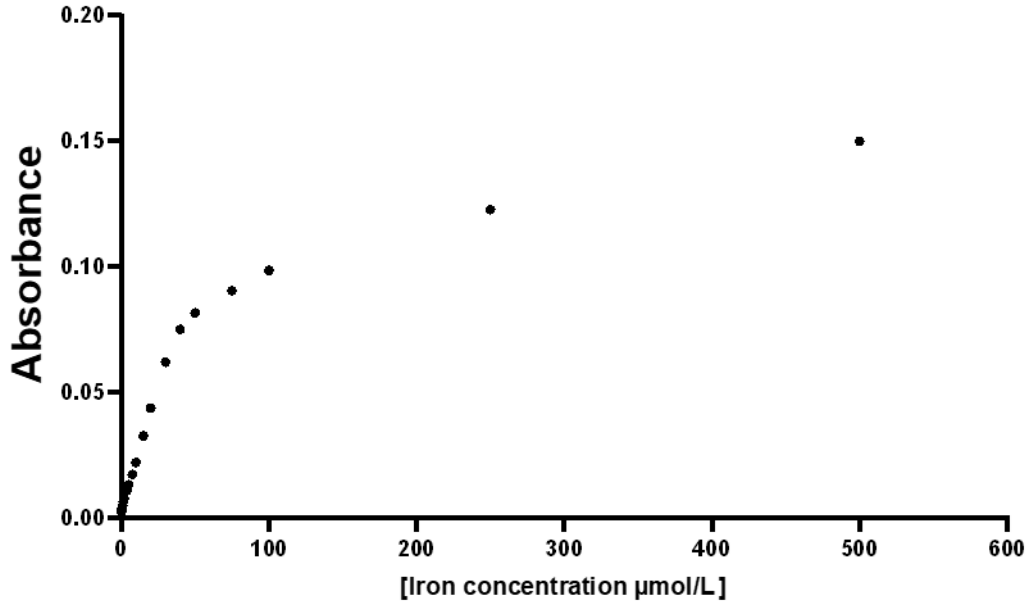
Geleneksel serum demiri ölçüm yönteminin eritrosit içindeki daha düşük demir düzeylerinde hassas ölçüm yapabilmesi için modifiye edilen parametreleri Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7: Geleneksel Serum Demir Ölçüm Yöntemi (70,72) ve Modifiye Edilen Eritrosit İçi Non-Hem Demir Ölçüm Yöntemi Arasındaki Farklar

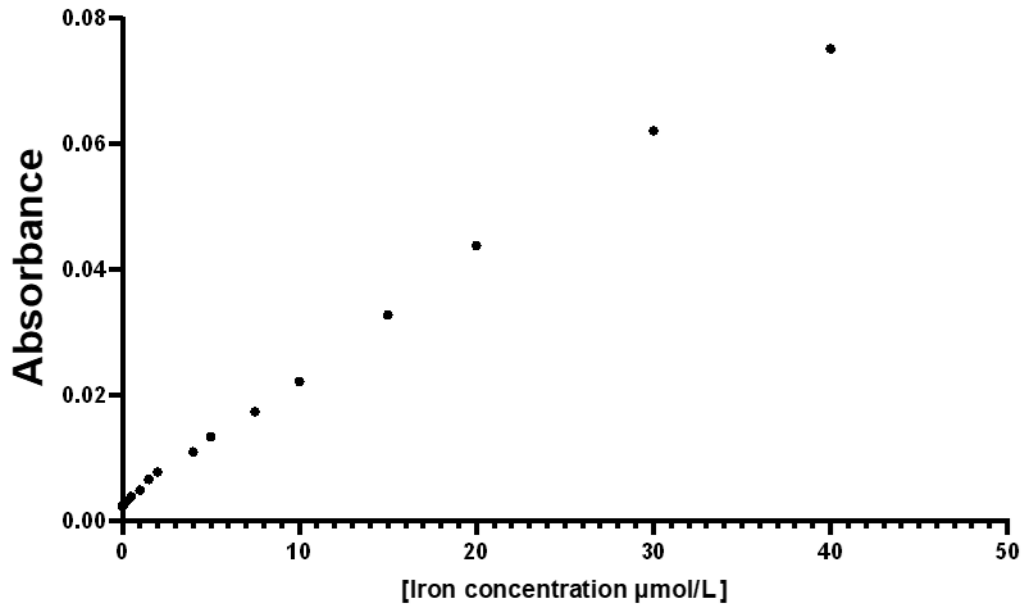
	Geleneksel Serum Demir Ölçüm Yöntemi	Modifiye Edilen Eritrosit İçi Non-Hem Demir Ölçüm Yöntemi
R1 hacmi	80	80
R2 hacmi	16	16
Reaksiyon örnek hacmi	25	25
Dilüe edilecek örnek hacmi	30	0
Dilüsyon hacmi	120	0
Reaktif içerikleri		
R1:	Asetat Tamponu Askorbik Asit Guanidium Klorid	Asetat Tamponu Askorbik Asit
R2:	Ferrozin Askorbik Asit Guanidium Klorid	Ferrozin Askorbik Asit

4.1.2 Linearite (Doğrusallık)

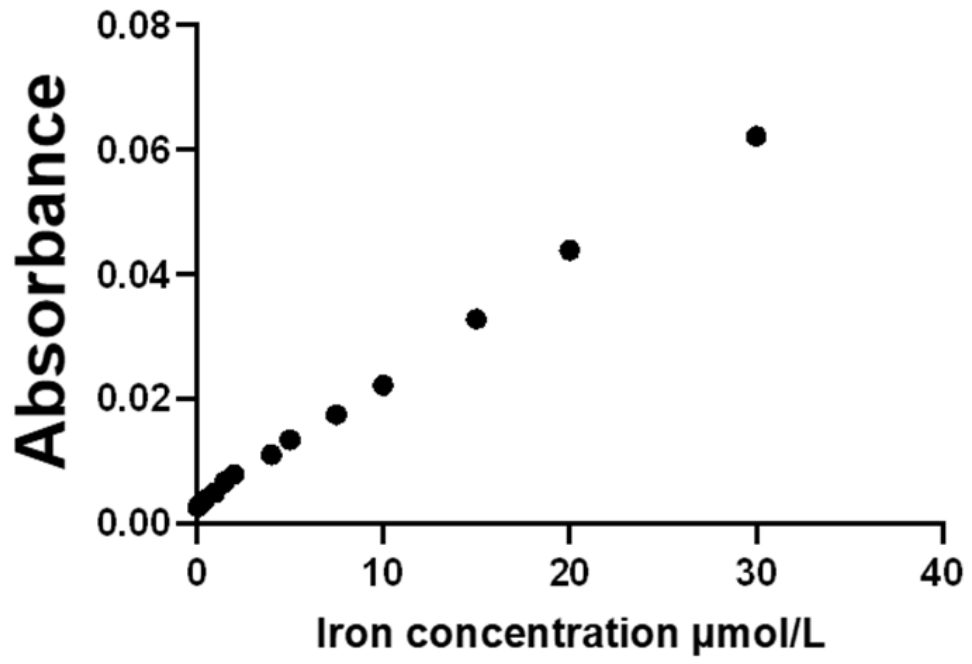
Linearitenin üst sınırı 40,8 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçülmüştür. Regresyon analizinde r^2 değeri 0,93; eğim (slop) 0,001 olarak bulunmuştur. Rutin serum demir ölçümlerinden daha düşük düzeylerde demirin doğrusal olarak ölçüldüğünü açık şekilde gösterebilmek için farklı konsantrasyonlardaki demir düzeylerine ait linearite grafikleri çizilmiştir (Şekil 14).



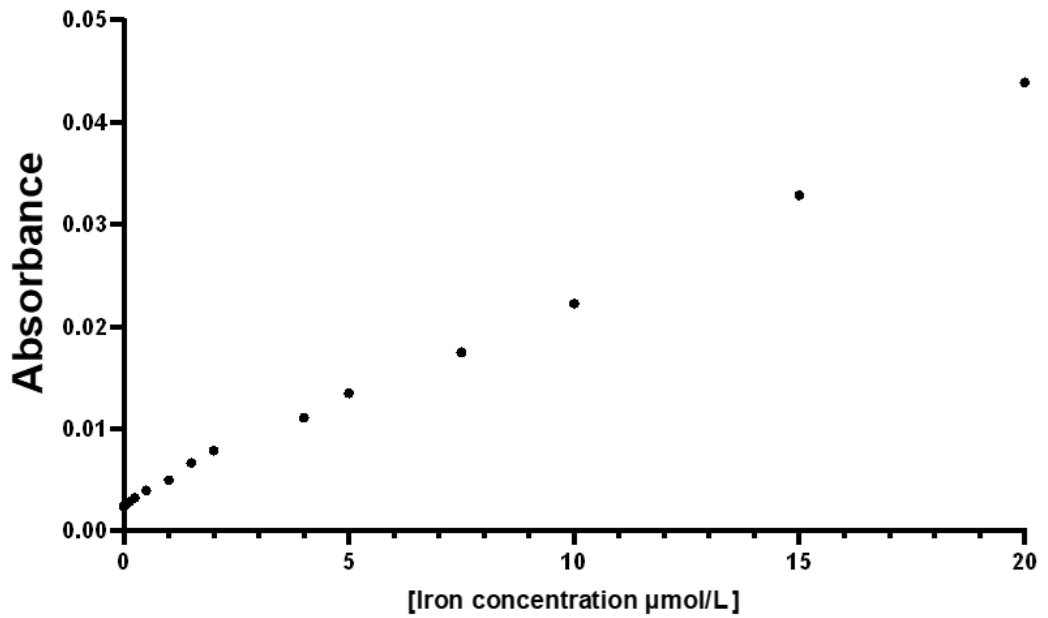
(A) 500 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



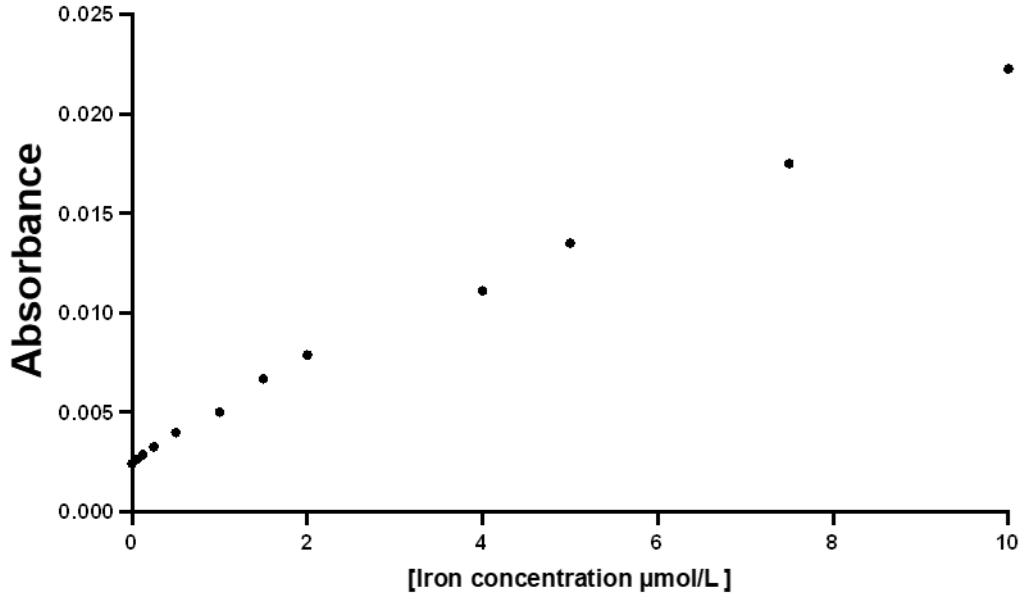
(B) 40 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



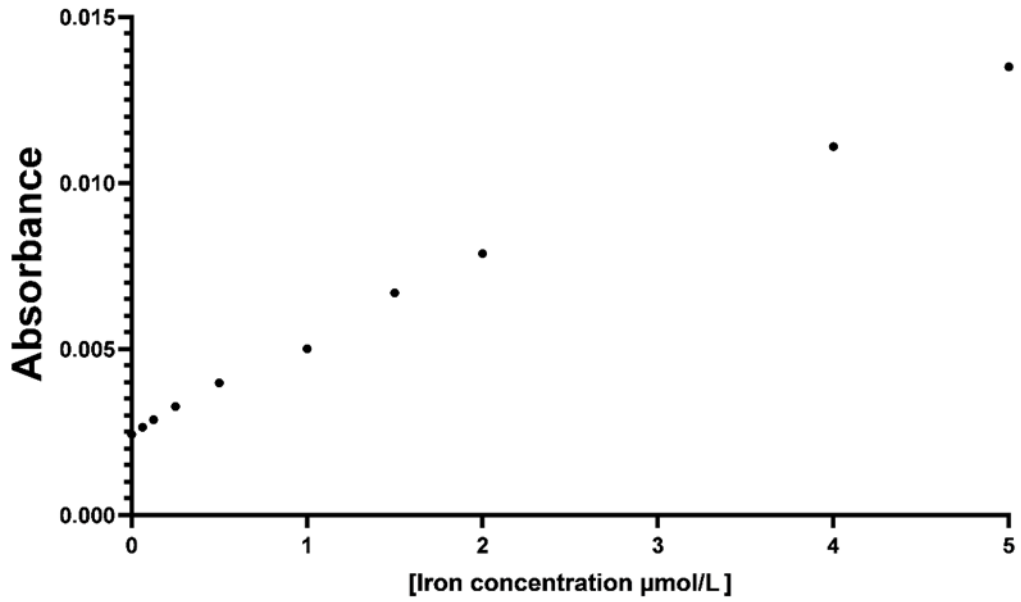
(C) 30 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



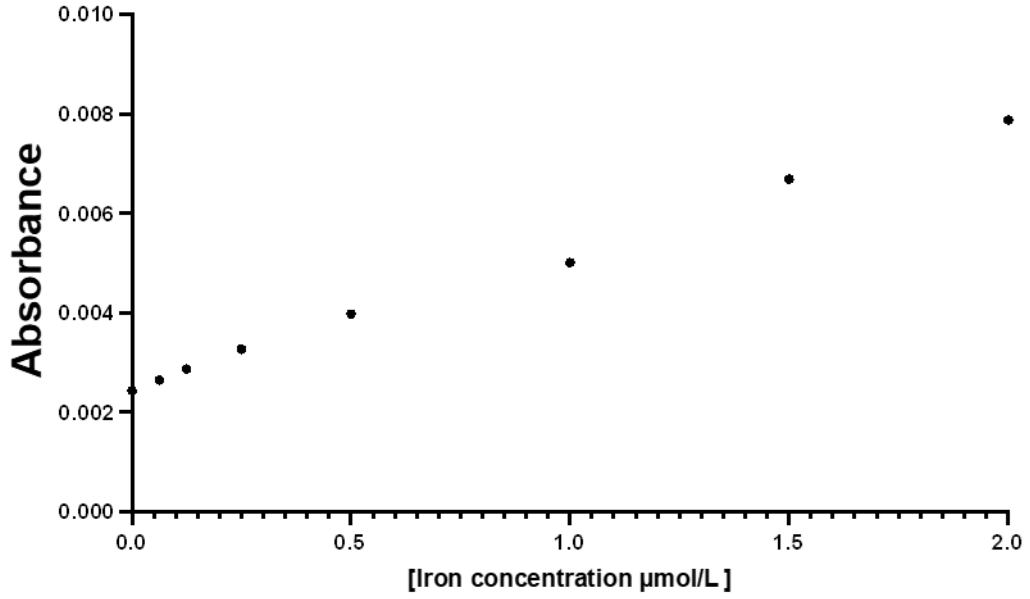
(D) 20 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



(E) 10 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



(F) 5 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık



(G) 2 mikromolar demir konsantrasyonunda doğrusallık

Şekil 14: Eritrosit içi non-hem demir ölçüm yöntemi linearite grafiği

4.1.3 Saptama Sınırı (Detection Limit):

Metodun saptama sınırı, sıfır kalibratör (deiyonize su) 10 kez ölçülerek belirlendi. Sonuçlar; ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde; $0,0165 \pm 0,0138 \mu\text{g/dl}$ olarak bulunmuştur. Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi dergisinin yayınladığı öneriler dikkate alınarak saptama sınırı (LOD)= $3,3 \times \text{SD}$ ve kantitasyon sınırı (LOQ)= $10 \times \text{SD}$ formülleri kullanılarak sırasıyla $0,04554 \mu\text{g/dl}$ ve $0,138 \mu\text{g/dl}$ olarak hesaplanmıştır (74).

4.1.4 Kesinlik Çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışması için düşük, orta, yüksek seviyelerde eritrosit içi non-hem demir içeren örnekler gün içinde 20 kez analiz edilerek ortalama ve standart sapma verileri hesaplanmıştır (Tablo 8) (75,76). Bu verilere göre hesaplanan varyasyon katsayısı (CV) %10'nun altında bulunmuştur.

Tablo 8: Düşük, orta ve yüksek seviyelerdeki eritrosit içi non-hem demir ölçümlerinin kesinlik/tekrarlanabilirlik sonuçları

Seviyeler (µg/dl)	Ölçüm Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	CV (%)
Yüksek	20	19,3	± 1,77	%9,2
Orta	20	14,1	± 0,88	%6,3
Düşük	20	6,8	± 0,31	%4,7

CV: Varyasyon katsayısı

Çalışmamıza 140 gönüllü birey katılmıştır. Bunlardan 70 tanesi β -talasemi majör hasta grubunda, 70 tanesi de sağlıklı kontrol grubunda yer almaktadır. Talasemi hasta grubuna genetik tanı veya elektroforez, tam kan sayımı, periferik yayma gibi testlerle hasta dahil edilmiştir. Talasemi hasta grubunda transfüzyondan hemen sonra kanı alınan 23 hastanın örneği çalışmadan dışlanmıştır. Kontrol grubunda numune miktarının yetersiz olmasından dolayı 17 katılımcı çalışmadan çıkarılmıştır. Toplamda talasemi hasta grubunda 47 katılımcı bulunurken sağlıklı kontrol grubunda 53 katılımcı bulunmaktadır. Talasemi hastalarının kılavuzlara göre rutin izlemlerinde aylık tam kan sayımı, üç ayda bir serum ferritin düzeyi takibi yer almaktadır. Bu hastaların transfüzyon ihtiyacını ve biriken demir düzeyini değerlendirmek için hemoglobin, hematokrit düzeyi ve serum ferritin düzeyleri izlemi yapılmaktadır. Tablo 9'de gruplar arası demografik, klinik ve laboratuvar özelliklerinin karşılaştırılması özetlendi.

Tablo 9: Talasemi ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri açısından karşılaştırılması

	Talasemi grubu (n=47)	Kontrol grubu (n=53)	p
Yaş (yıl)	17,9 (10-28)	20,3 (14-28)	>0,05
Cinsiyet (K-E)	22 K (%47) - 25 E (%53)	24K(%45) –29 E (%55)	>0,05
Hemoglobin (g/dL)	9,2 (5,5-11,1)	14 (12,1-16,9)	<0,001*
Hematokrit (%)	28,05 (16-33,9)	43 (37,3-52,8)	<0,001*
Eritrosit ($\times 10^{12}/L$)	3,36 \pm 0,54	4,91 \pm 0,5	<0,001*
MCV (fL)	82,35 (60,0-87,3)	89,7 (80,9-98,7)	<0,001*
MCH (pg/hücre)	26,9 (18,0-29,3)	29,2 (25,3-32,7)	<0,001*
MCHC (g/dL)	32,72 \pm 1,42	32,52 \pm 0,87	>0,05
RDW (%)	17 (14,0-32,4)	13,5 (12,0-17,4)	<0,001*
Ferritin (μ g/L)	1599 (566-4141)	22 (10-154)	<0,001*
Eritrosit içi non-hem demir (μ g/dL)	12,57 (6,8-36,2)	15,87 (9,52-27,84)	<0,001*
Standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyi (μ g/g)	1,64 \pm 0,5	1,17 \pm 0,24	<0,001*

MCV: mean corpuscular volüme, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width

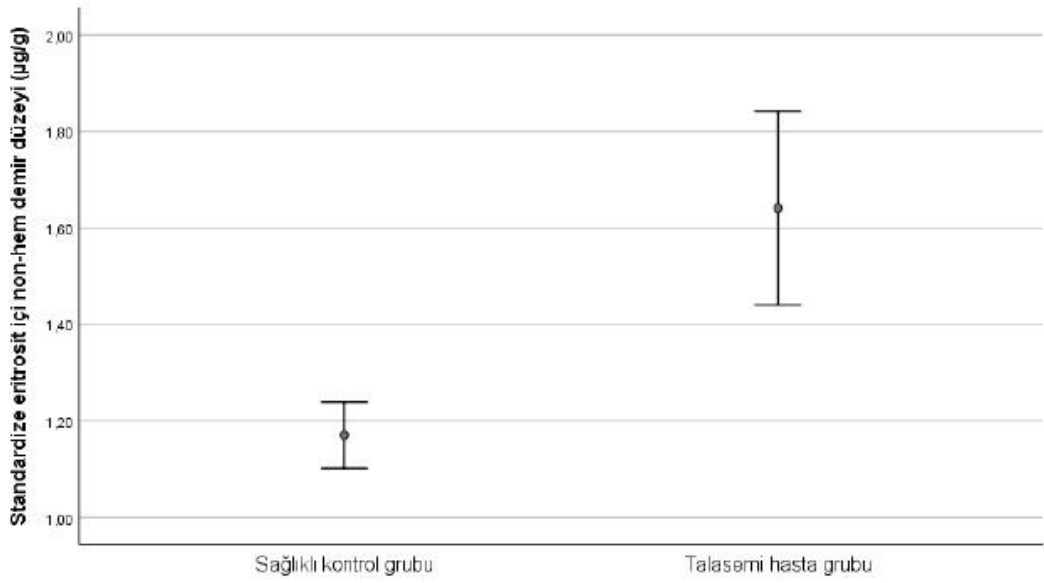
* Mann-Whitney U ya da Independent Sample T test analizinde istatistiksel anlamlılık saptanan veriler

NOT: Normal dağılıma uygun olan parametreler 'ortalama \pm standart sapma' olarak, normal dağılıma uygun olmayan parametreler ise 'ortanca (min-max)' olarak ifade edilmiştir. Kategorik veriler sayı ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

Tablo 9'da gruplar arasında istatistiksel anlamlılık verileri yer almaktadır. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). Tam kan sayım parametreleri incelendiğinde; gruplar arasında hemoglobin, hematokrit, eritrosit düzeyi açısından anlamlı farklılıklar tespit edildi. Bu üç parametre de talasemi hasta grubunda daha düşük düzeylerdeydi. Yine MCV, MCH, RDW düzeyleri gruplar arasında anlamlı olarak farklıydı. MCV, MCH parametreleri talasemi hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük düzeylerdeydi, RDW talasemi hasta grubunda daha yüksek düzeydeydi. Talasemi ve sağlıklı kontrol grupları arasında ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) düzeyleri grup ortalamaları benzerdi, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p> 0,05$).

Biyokimya parametrelerinden ferritin incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. Talasemi hasta grubunda daha yüksek ferritin düzeyleri

görülmektedir. Araştırılmak istenen parametre eritrosit içi hemoglobine bağlı olmayan demir düzeyi gruplar arasında anlamlı derecede farklıydı. Eritrosit içi non-hem demir hemoglobine oranlanarak elde edilen standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık vardır ve talasemi hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek miktarda standardize eritrosit içi non-hem demir (hemoglobin başına düşen demir miktarı) bulunmaktadır.



Şekil 15: Sağlıklı kontrol ve talasemi hasta grubunda standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin error bar grafiği ($\bar{x} \pm \sigma\bar{x}$)

Sağlıklı kontrol ve talasemi hasta grubunda standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin error bar grafiği Şekil 15’de verilmiştir. Talasemi hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeyde standardize eritrosit içi non-hem demir olarak adlandırılan hemoglobin başına düşen demir düzeyi vardı.

Tablo 10: Talasemi ve sağlıklı kontrol grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu

n=100	Standardize hemoglobin başına düşen demir (µg/g)	Eritrosit içi non-hem demir (µg/dL)	Eritrosit (x10 ¹² /L)	Hemoglobin (g/dL)	Hematokrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg/hücre)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Ferritin (µg/L)
Standardize hemoglobin başına düşen demir (µg/g)	1	r=0,454 p<0,001*	r= - 0,425 p<0,001*	r= - 0,463 p<0,001*	r= - 0,453 p< 0,001*	r= - 0,413 p<0,001*	r= - 0,370 p<0,001*	r=-0,116 p= 0,251	r= 0,287 p= 0,004*	r= 0,428 p<0,001*

MCV: mean corpuscular volüme, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width

* Pearson ya da Spearman korelasyon analizine göre istatistiksel anlamlılık saptanan parametreler

Tablo 11: Talasemi hasta grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu

n=47	Standardize hemoglobin başına düşen demir (µg/g)	Eritrosit içi non-hem demir (µg/dL)	Eritrosit (x10 ¹² /L)	Hemoglobin (g/dL)	Hematokrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg/hücre)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Ferritin (µg/L)
Standardize hemoglobin başına düşen demir (µg/g)	1	r= 0,745 p< 0,001*	r= - 0,346 p= 0,017*	r= - 0,649 p< 0,001*	r= - 0,541 p< 0,001*	r= - 0,411 p= 0,004*	r=-0,432 p= 0,002*	r=-0,294 p= 0,045*	r= 0,301 p= 0,04*	r= 0,3 p= 0,048*

MCV: mean corpuscular volüme, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width

* Pearson ya da Spearman korelasyon analizine göre istatistiksel anlamlılık saptanan parametreler

Tablo 12: Sağlıklı kontrol grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu

n=53	Standardize hemoglobin başına düşen demir (µg/g)	Eritrosit içi non-hem demir (µg/dL)	Eritrosit (x10 ¹² /L)	Hemoglobin (g/dL)	Hematokrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg/hücre)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Ferritin (µg/L)
Standardize hemoglobin başına düşen demir(µg/g)	1	r= 0,897 p< 0,001*	r= 0,074 p= 0,597	r= - 0,012 p= 0,934	r= - 0,019 p= 0,894	r= - 0,067 p= 0,632	r= 0,027 p= 0,85	r= 0,133 p= 0,341	r= 0,248 p= 0,073	r= 0,155 p= 0,268

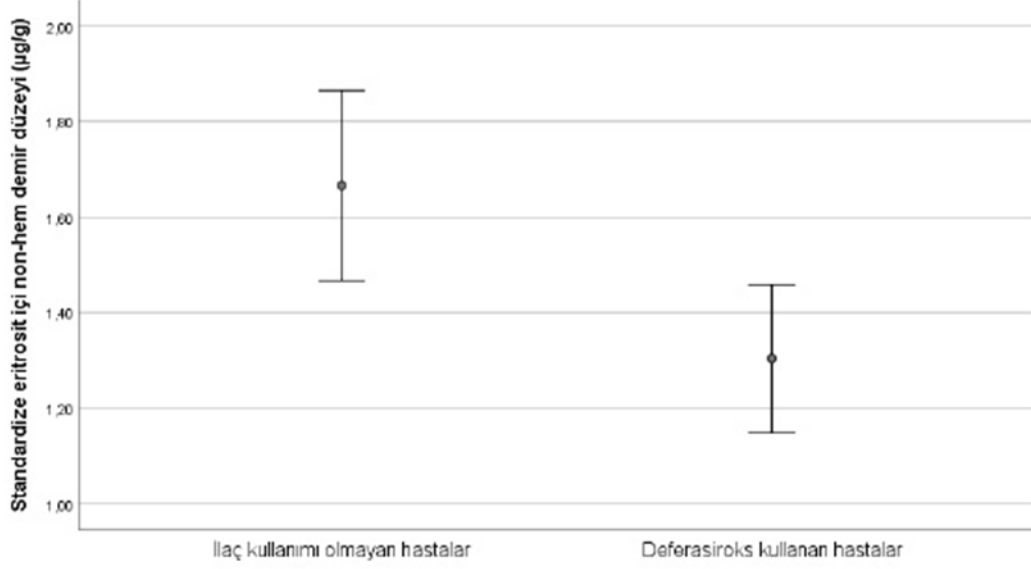
MCV: mean corpuscular volüme, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width

* Pearson ya da Spearman korelasyon analizine göre istatistiksel anlamlılık saptanan parametreler

Talasemi ve sağlıklı kontrol grubunda standarize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar değerleri ile korelasyonu Tablo 10'da verildi. Ölçülen standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyi parametresinin MCHC dışında diğer parametrelerle anlamlı korelasyonu vardı. Standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCV ve MCH parametreleriyle arasında negatif korelasyon vardı. Standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin RDW ve ferritin düzeyiyle arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki bulunmaktadır.

Talasemi grubunda standarize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar değerleriyle olan korelasyonu Tablo 11'da verildi. Standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin eritrosit içi non-hem demir, RDW ve ferritin düzeyiyle pozitif anlamlı korelasyonu vardı. Standardize eritrosit içi non-hem demirin hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC ile anlamlı negatif korelasyonu vardı.

Tablo 12'de sağlıklı kontrol grubunda standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar parametreleriyle korelasyonu verildi. Sağlıklı kontrol grubunda standardize hemoglobin başına düşen demirin eritrosit içi non-hem demir düzeyiyle yüksek düzeyde anlamlı korelasyonu vardı. Standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyinin diğer laboratuvar değerleriyle anlamlı ilişkisi yoktu ($p>0,05$). Sağlıklı kontrol grubunun standardize hemoglobin başına düşen demir düzeyiyle serum demiri arasında anlamlı korelasyon yoktu ($r= 0,223$ $p= 0,127$).



Şekil 16: Şelasyon tedavisi olarak deferasiroks alan hastalar ve hiç ilaç kullanmayan hastalar arasında hemoglobine başına düşen demir düzeyi error bar grafiği ($\bar{x} \pm \sigma$)

Talasemi hastalarının şelasyon için kullandıkları ilaç türleri incelendi. Hastaların 27 tanesi deferasiroks, 2 tanesi deferipron, 8 tanesi hem deferasiroks hem de deferipronu beraber kullanmaktayken, hastaların 10 tanesi herhangi bir şelasyon tedavisi almamaktaydı. İlaç kullanımı olmayan 10 hasta ve herhangi bir ilaç kullanımı olan 37 hastanın hemoglobine başına düşen demir düzeyinin ilaç kullanım durumuna göre anlamlılık düzeyi incelenmiştir. Hemoglobine başına düşen demir düzeyinin ilaç kullanımı olmayan hastalardaki medyan (min- max) değeri 1,72 µg/g (1,15- 2,04) iken, herhangi bir ilaç kullanımı olan hastalarda medyan 1,36 µg/g (0,65- 2,35) bulundu. Bu iki grup arasında hemoglobine başına düşen demir düzeyi açısından anlamlı farklılık bulundu ($p=0,03$). Şelasyon tedavisi olarak deferasiroks alan hastalar ve hiç ilaç kullanmayan hastalar arasında hemoglobine başına düşen demir düzeyi error bar grafiği Şekil 16'da gösterilmektedir. Şelasyon amaçlı hiçbir ilaç kullanmayan hastalarla şelasyon amaçlı deferasiroks alan hastaların hemoglobine başına düşen demir düzeyleri

medyan (min-max) değerleri sırasıyla 1,72 µg/g (1,15- 2,04) ve 1,24 µg/g (0,65- 2,35) bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p= 0,005). İlaç kullanımı olmayan hastalarda ferritinin ortancası 1483 µg/L (566-2591) iken, ilaç kullanımı olanlarda 1618 µg/L (584-4141) bulundu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p>0,05).

5. TARTIŞMA

Talasemi, globin zincirinde sentez bozukluğundan kaynaklanan hemoglobin üretiminin azalmasıyla ve biriken globin zincirinin neden olduğu membran hasarı ve prematür hücrelerin ölümüyle ortaya çıkan inefektif eritropoezle karakterize genetik bir bozukluktur (4). Kan hücrelerinin olgunlaşmasının bozulması bütün vücudu etkileyecek sistemik değişiklikleri başlatır. Hemoliz ve inefektif eritropoezle birlikte aneminin ortaya çıkması böbreklerden EPO salgılanması ve extramedüller hematopoezin aktifleşmesini sağlar. Bununla birlikte hepsidin üretiminin artmasıyla kan hücrelerinin yapımı için gerekli olan demir emilimi artmış olur (65).

Özellikle β-talasemi majör hastalarında ağır derecede anemi olması transfüzyon ihtiyacını ortaya çıkarır. Bu hastaların düzenli izlemlerinde hemoglobin düzeyi dikkate alınarak sıklıkla kan transfüzyonu yapılır ve düzenli transfüzyon da vücuttaki demir düzeyini artırır. Hem emilimin artması hem de tedavi amaçlı yapılan transfüzyonlarla artan demir, doku ve organlarda birikir ve biriktiği organlarda fonksiyon bozukluğuna sebep olur (1,65). Talasemi hastalarında özellikle kalp ve karaciğerde biriken demir MR ve/veya biyopsi ile takip edilir. Kalpte biriken demire bağlı ortaya çıkan kardiyak komplikasyonlar hastalarda en sık ölüm nedenidir (8). Sık transfüzyonlarla vücutta biriken demir sadece karaciğer, kalp, sinir sistemi gibi dokuları değil eritroid hücreleri de etkilemektedir (9,77).

Çalışmamızda talasemi hastalarının doku ve organlarında biriken demirin eritrositlerde ne düzeyde biriktiğinin araştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda demir birikimi izleminde kullanılan doku demirini gösteren ferritinin eritrosit içinde biriken demirle ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu ve talasemi grubunun eritrositleri içinde biriken hemoglobine bağlı olmayan demir düzeyinin hemoglobine oranlanarak hesaplaması Şekil 15'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi araştırmamızda hipotezimizi destekleyecek şekilde talasemi hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek düzeyde hemoglobin başına düşen demir düzeyi tespit edildi (Tablo 9). Bu da bize talasemi hastalarının doku ve organlarında biriken demirin eritrosit hücrelerinde de biriktiğini göstermektedir. Literatürü incelediğimizde Prus ve Fibach'ın 2008 ve 2010 yıllarında talasemi hastalarının eritrositlerinde flow sitometri yöntemiyle yapmış oldukları çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak talasemi hastalarında daha yüksek labil demir havuzu olduğunu bulmuşlardır (5,9). Prus ve Fibach, bu sonuçla birlikte LIP (karasız demir havuzu) ve oksidatif stres parametrelerinin ölçülmesinin, şelasyon tedavi yanıtının değerlendirilmesine katkı sağlayacağı şeklinde yorum yapmışlardır (9). Prus ve Fibach'ın 2008 yılında kültür eritroid hücrelerinde yaptıkları çalışmada da talasemi hücrelerinin normal hücrelere göre daha yüksek LIP düzeyi içerdiklerini bulmuşlar ve bu durumu dengesiz globin zincir üretimine bağlamışlardır (5). 2018 yılında Chutvanichkul ve ark. yaptıkları çalışmada β -talasemi hastalarının eritrositlerinde sağlıklı bireylerin eritrositlerine göre labil demirin daha yüksek miktarda bulunduğunu floresan yoğunluğun artması şeklinde göstermişlerdir (4). Bu çalışmada floresan bazlı flow sitometri tekniği kullanarak yapılan ölçümlerde eritrosit kararsız demir havuzunun normal hücrelerle karşılaştırıldığında talasemik eritrositlerin 1,5 kat daha yüksek eritrosit LIP düzeyine sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma aynı zamanda eritrosit içinde serbest demirin artmasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı bunun ortaya çıkardığı oksidatif stresle hücre zarı lipid peroksidasyonu ve hücre apoptozuna yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır (4,78,79). Chutvanichkul ve ark.'nın 2023 yılında yayınlanan raporunda transfüzyona bağımlı ve bağımlı olmayan hastaları sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslamış ve talasemi hastalarının transfüzyon alıp almamasından bağımsız olarak sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha yüksek eritrosit LIP düzeyi tespit etmişlerdir. Bunun yanında transfüzyon alan talasemi hastalarının LIP seviyesinin transfüzyon almayan talasemi hastalarına göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (80).

Başka bir çalışma talasemi hastalarında eritrositlerde şekil değişikliğinin reaktif oksijen türleri ve serum ve eritrosit ferritini üzerindeki etkisini araştırmış ve talasemi

hastalarında şekil değişikliği olan eritrositlerin normositlere göre daha fazla ROS ve demir birikimi olduğunu göstermişlerdir (77).

Yapılan çalışmalar LIP düzeyini etkileyen başka bir parametre daha buldular: eritrosit olgunlaşmasıyla birlikte hücredeki LIP düzeyi değişiklik göstermektedir. Prus ve Fibach'ın yayınladığı raporda eritrosit maturasyonu arttıkça LIP düzeyinin azaldığını gösterdiler (5). Çalışmaya göre çekirdekli eritrositlerin olgunlaşmış eritrositlere göre 8,8 kat daha yüksek hücre içi LIP içerdiklerini bulmuşlardır. Bunu da talasemi gibi patolojik değişikliklerin yanı sıra eritrosit olgunlaşması gibi fizyolojik süreçlerin de LIP'i etkileyeceği şeklinde açıklamışlardır. Chaichompoo ve ark.'nın 2019 yılında yayınladıkları raporda ilk defa eritrosit morfolojik değişiklikleriyle eritrosit ferritini ve ROS birikimi arasında ilişki olduğunu vurgulamışlardır. Talasemi hastalarında anormal şekilli eritrositleri hücrel stresle ilişkilendirmişler ve talasemi hastalarında demir yüklenmesiyle normosit sayısında azalma olduğunu bulmuşlardır (77).

Talasemi ve sağlıklı kontrol grubunda bakılan parametreler karşılaştırıldığında MCHC dışındaki bütün laboratuvar değerlerinin iki grup arasında anlamlı farklılıklara sahip olduğu bulundu (Tablo 9). Talasemi hastalarının eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH değerlerinin sağlıklı kontrollere kıyasla düşük olması hastalıkla gözlenen mikrositoz, anemi gibi bulguları açıklamaktadır. Yine talasemi hastalarında RDW değeri sağlıklı kontrol grubuna kıyasla yüksek miktarda bulunmuştur, bu da hastalıktaki poikilositoza bağlı olarak beklenen bir bulgudur. İki grup arasında ferritin düzeyinde anlamlı farklılık olması talasemi hastalarında hem hastalığa hem de sık yapılan transfüzyonlara bağlı olarak demir birikiminin olmasına işaret etmektedir. İki grupta da eritrosit içi heme bağlı olmayan demir düzeyleri arasında anlamlı farklılık vardı (Tablo 9). Eritrosit içi non-hem demir düzeyi sağlıklı kontrollerde daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu durum talasemi hastalarına göre sağlıklı kontrollerde eritrosit sayılarının daha fazla olmasına bağlı olarak toplamda daha yüksek demir düzeylerine neden olmuştur. Demir düzeyleri hemoglobine oranlandığı zaman hemoglobin başına düşen demir düzeyini daha objektif olarak değerlendirme imkanı sunar.

Bütün katılımcılar karşılaştırıldığında standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin laboratuvar parametreleriyle ilişkisi Tablo 10'da değerlendirilmiştir. Buna göre hemoglobin başına düşen demir düzeyinin MCHC düzeyi dışında bütün parametrelerle anlamlı korelasyonu vardır. Hemoglobin başına düşen demir düzeyinin hesaplanması hemoglobin parametresini içerdiği için hemoglobin, eritrosit, hematokrit düzeyleriyle negatif düzeyde anlamlı korelasyonu olması beklenen bir durumdur. Bunun yanında MCV ve MCH ile de anlamlı negatif korelasyonu vardır. Eritrosit volümü arttıkça ve içeriğindeki hemoglobin arttığında standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyi azalmaktadır. Bütün bireylerde ferritin düzeyi arttıkça hemoglobin başına düşen demir miktarı da artmaktadır. Vücutta demir birikimi olduğunda fazla miktardaki demir eritrosit içinde de artmaktadır.

Talasemi hastaları değerlendirildiğinde hemoglobin başına düşen demir düzeyiyle eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH ve MCHC ile anlamlı negatif korelasyon olduğu bulunmuştur (Tablo 11). Chutvanichkul ve ark.'nın raporunda da sonuçlarımızla benzer şekilde eritrosit içindeki labil demir havuzu düzeyiyle hemoglobin, MCH, MCHC arasında negatif yönde anlamlı korelasyon bulunduğu belirtilmiştir (4) (sırasıyla $r = -0,66$, $p = 0,028$; $r = -0,63$, $p = 0,037$; $r = -0,61$, $p = 0,044$). Bu sonucu yüksek LIP düzeylerinin beta talasemi hastalarında hipokromik anemiye etkilediği şeklinde açıklamışlardır. Ancak MCV ile eritrosit içi labil demir düzeyi arasında anlamlı korelasyon tespit etmemişlerdir (4) ($r = -0,44$, $p = 0,171$). Biz çalışmamızda MCV ile de anlamlı negatif korelasyon bulduk. Bu durum hasta sayılarından kaynaklı bir farklılık olabilir, Chutvanichkul ve ark.'nın yaptığı çalışmada 30 talasemili hasta dahil edilmiş. Örneklem büyüklüğü artırıldığında testin anlamlılığının değişebileceği düşünülmüştür.

Standardize eritrosit içi non-hem demir düzeyinin ferritin düzeyiyle arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu durum yine hipotezimizi destekleyecek şekilde bir sonuçtur. Vücutta demir düzeyi arttıkça hemoglobin başına düşen demir düzeyi de artmaktadır. Bunun yanında ferritin düzeyiyle eritrosit içi demir düzeyinin yüksek düzeyde korele olması beklenen bir durum değildir. Çünkü ferritin düzeyi vücuttaki demir yükünü direkt olarak göstermez, bir akut faz reaktanı olarak enfeksiyon durumlarında da artabilir ve yanıtı etkileyebilmektedir (81,82). 2023 yılında Chutvanichkul ve ark.'nın yaptığı çalışmada transfüzyona bağımlı olan ve olmayan

hastaları değerlendirmiş ve her iki grupta da serum ferritin düzeyiyle eritrosit LIP düzeyi arasında korelasyon bulamamışlardır (80).

Sağlıklı kontrol grubunda hemoglobin başına düşen demir düzeyi ile hematolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Tablo 12). Sağlıklı kontrol grubunda biyokimya parametrelerinden serum demir düzeyi ile hemoglobin başına düşen demir düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($r=0,223$, $p=0,127$). Bu durum serum demirinin eritrosit içindeki demiri yansıtmadığını göstermektedir.

Hastalar demir birikimi açısından doku demiri olan ferritin düzeyi ile takip edilmektedir. Talasemi tanı ve tedavi kılavuzlarında üç ayda bir ferritin izlemi önerilmektedir. Ferritin düzeyi aynı zamanda transfüzyon sonucu biriken demiri vücuttan atmak için verilen şelasyon tedavisinin doz ayarlamasında da kullanılmaktadır. Ancak serum ferritin takibinin bazı ciddi dezavantajları bulunmaktadır (64). Serum ferritini doku demirini direkt göstermez. Direkt doku demirini gösteren testler biyopsi ve MR'dır. Ancak bu tetkikler de zaman alıcı, invaziv, maliyetli ve zor tetkiklerdir. Serum ferritini demir yükünün indirekt göstergesidir. Ferritin yüksek demir yüküne doğrusal olmayan bir tepki gösterir, demir yüküyle orantılı artma yoktur, serum ferritinde azalmanın olmaması yanıtı engellemez (64). Ferritin kendisine bağlanmış olan demir yükünü gösterir ama bunun haricinde herhangi bir yere bağlanmayan asıl zarar verebilecek olan demir yükünü göstermez. Bunun yanında ferritin bir pozitif akut faz reaktanıdır ve birçok durumda serum düzeyleri artmaktadır bu da talasemi hastalarında birikime bağlı bir artma mı oldu yoksa enfeksiyona bağlı bir artma mı olduğu konusunda ayrımı zorlaştırmaktadır (9,83). Bizim çalışmamızda ölçtüğümüz hemoglobin başına düşen demir düzeyi ferritinin etkilendiği interferanslardan etkilenmemektedir. Hücresel düzeyde ölçüm yapıldığı için demir düzeyinin direkt bir göstergesidir.

Serum ferritini transfüzyona bağımlı olmayan hastalarda da demir birikimini göstermek için her zaman yeterli olmamaktadır. Ali ve ark.'nın yayınladığı vaka sunumunda; 44 yaşında Hemoglobin H hastalığına sahip transfüzyon ihtiyacı olmayan hastanın izlemleri ferritinle yapılmaktadır. Ferritin düzeyi bu hastada morbidite riskiyle uyumlu olmamasına rağmen yapılan karaciğer MR'da yüksek düzeyde demir

birikimi tespit edilmiş ve deferasiroks başlanmıştır. Deferasiroks tedavisinin ardından karaciğerdeki demir birikimi gerilemiştir. Bu vakayla birlikte çıkardıkları sonuç: transfüzyona bağımlı olmayan hastalarda transfüzyona bağımlı hastalara göre aynı düzeydeki karaciğer demir birikimi için ferritin düzeyleri transfüzyona bağımlı hastalarda daha düşük izlenmektedir (84). Bu durum da yine, sadece ferritin izleminin demir yükü durumunu yansıtamadığını göstermektedir.

Literatür incelendiğinde demir yükünü değerlendirmeye yönelik birçok çalışma yapıldığı görülmektedir. Çalışmalar genellikle bağı olmayan demir formu üzerindedir. Çünkü doku ve organlara toksik etkileri olan asıl zararlı form herhangi bir yere bağı olmayan ya da bağılandığı yerden kolayca ayrılmaya elverişli olan demir formudur. Bu demir formlarının önceki çalışmalarda serbest/labil şeklinde ayrımı yapılmıştır. Serbest demir 'reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etme yeteneğini koruyacak şekilde bağılanmış demir' olarak tanımlanırken, labil demir 'düşük afiniteli ligandlara bağı demir iyonu' olarak açıklanmıştır (4,9,10).

Normal koşullarda serum demiri transferrine bağıdır. Transferrine bağı olmayan demir serumda transferrin doygunluğu %70'e ulaştığında serumda dolaşan şelatlanabilir demir olarak tanımlanır (17,85). NTBI'nın Fe^{3+} tarafından oluşturulduğu söylenir (17). NTBI nitritotriasetat denilen şelatlama maddesi kullanılarak ölçülür. Demir bağı halde bulunmadığında oksidatif stressi artırarak hücre apoptozu ve doku hasarına sebep olmaktadır. Önceki çalışmalarda sıklıkla labil plazma demiri olarak adlandırılan transferrine bağı olmayan plazma demirini ölçmüşlerdir (11,12,86). Esposito ve ark.'nın yaptığı çalışmada non-transferrin bağı demir ve kararsız plazma demiri florojenik dihidrorodamin 123 ile değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerin serumlarında bulunmayan LPI'nın talasemi hastalarının serumlarında yüksek düzeylerde bulunduğunu gösterdiler (87).

Plazmada ölçülen NTBI'nin demir şelasyon tedavisi yanıtının izleminde kullanılabileceği bildirilmiştir (4,12,88). Piga ve ark.'nın raporunda 155 talasemi majör, 19 talasemi intermedialı hastalarda NTBI düzeyleri ölçülmüş ve %83'ünde NTBI varlığını göstermişlerdir (89). Bunun yanında prelinik kardiyak hasarın NTBI seviyeleriyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır (89). NTBI sadece talasemi hastalarında değil sık transfüzyon alan diğer hasta gruplarında da çalışılmış. Jatavan ve ark.'nın

2023 yılında yaptığı çalışmada hemoglobin Bart hastalığına sahip fetüslerde de normal fetüslere göre anlamlı derecede yüksek NTBI düzeyleri tespit etmişlerdir (90). Fetal plazma kararsız demirinin hemoglobin düzeyiyle ters orantılı korelasyonu olduğunu, serum demir düzeyiyle ise anlamlı korelasyona sahip olmadığını bulmuşlardır. Bu sonuç da geleneksel yöntemlerle ölçülen serum demirinin kararsız plazma demirini öngöremeyeceğini ortaya koymaktadır.

Bu yayınlarla birlikte oksidatif stresle ilişkilendirilen serbest, labil ya da bağlı olmayan demir formu gibi birçok isimlendirmeye anılan ve ölçülmeye çalışılan bir demir formu olduğu görülmektedir. Bu formun serum demirinden ayrı olduğu ve serumda bakılacaksa özellikle transferrine bağlı olmayan formun ölçüldüğü, bunun yanında serum haricinde hücre içlerinde de düzeyi araştırılmak istenen demir formu olduğu dikkati çekmektedir. 2002 yılında Nilsson ve ark. serbest demir olarak adlandırdıkları kromojenik şelatör olarak batofenentrolin maddesini kullandıkları ferröz ve ferrik demir iyonlarını ölçebilen spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir (10). Mikrodiyalizat, beyin-omurilik sıvısı ve plazmada hayvan modellerinde serbest demiri ölçmüşlerdir. Riemer ve ark. 2004 yılında kolorimetrik ferrozün bazlı demir ölçüm yöntemi geliştirmişler ve kültür hücrelerinde demiri ölçmüşlerdir (3). 2018 yılında Hedayati ve ark.'nın yayınladığı raporda ferene ile optimize edilmiş triazin bazlı kolorimetrik yöntem geliştirmişler (91). Deneyi nanopartikülle inkübe ettikleri insan prostat karsinoma hücrelerinde yapmışlardır.

Abbasi ve ark. 2021 yılında hepatosit hücre kültüründe, demir yüklemesi yapılan fare modellerinde ve fare plazmasında demir ölçümünü ferene bazlı yöntem kullanarak yapmışlardır (1). Yine hücre içi serbest demiri ölçen bir başka çalışma 1998 yılında Buonocore ve ark.'nın yaptığı diğerlerinden farklı olarak HPLC kullanılarak yapılan intra-eritrosit serbest demiri ölçen yayındır. Yazarlar term ve preterm bebeklerde entübe edilen ve edilmeyen gruplarda eritrosit içi serbest demir düzeyini değerlendirmişlerdir (13). Bu çalışmalarda görüldüğü gibi bağlı olmayan demir formu kolorimetrik, flow sitometri, HPLC gibi birçok teknikle ölçülmüştür. Bu yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları farklıdır. Günümüzde rutin demir ölçümü numune türü olarak sıklıkla serum kullanılarak ferene veya ferrozün kromojenleri aracılığıyla kolorimetrik olarak yapılır. Biz de çalışmamızda ferrozün bazlı kolorimetrik yöntemi

ölçüm methodu olarak kullandık. Kolorimetrik yöntemler flow sitometri ve HPLC'nin aksine daha hızlı, kolay, ucuz, otomatize ve her laboratuvarında bulunabilen tekniklerdir.

Talasemi hastalarının şelasyon amaçlı aldıkları tedavilerle eritrosit içinde hemoglobine bağlı olmayan demir düzeyi arasında nasıl bir ilişki olduğunu inceledik. Buna göre hasta grubumuzda olan herhangi bir ilaç kullanımı olmayan 10 hasta ve örneklerimizdeki hastalar içinde en fazla tercih edilen ilaç olarak deferasiroks kullanan 27 hastanın hemoglobin başına düşen demir düzeyleri incelendiğinde ilaç kullanımı olmayan talasemi hastalarının demir düzeylerinin deferasiroks kullanan hastalara göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 16). Bu durum şelasyon tedavisi olarak kullanılan deferasiroksun eritrosit içi demir düzeyini etkili olarak azalttığını göstermektedir. Talasemi hastalarının şelasyon amaçlı aldıkları çeşitli ilaçların eritrosit içi demire etkisini inceleyen bir çalışmada rutinde deferoksamin alan hastaların tam kan örneklerini in vitro şartlarda deferoksamin, deferasiroks ve deferipronla inkübe ederek flow sitometrik eritrosit içi demir analizi yapmışlar ve kontrol grubunda olan ve şelasyonlarla muamele edilmeyen hastaların örneklerinde demire bağlanma daha az tespit etmişlerdir. Bunun yanında talasemi hastalarında deferipron ve deferasiroksla 1 saatlik inkübasyondan sonra eritrositlerdeki kalsein floresansının arttığını yani labil demir havuzunu azalttığını gösterdiler (9). Şelasyon tedavileri talasemi hastalarında uzun süreli transfüzyonlara bağlı demir birikiminin önlenmesi için kullanılmaktadır. Özellikle pediatrik popülasyonda şelasyonlar demir birikiminin uzun dönem etkilerini azaltarak hayat kalitesini etkilemektedir. Bu amaçla en sık kullanılan ilaçlar deferoksamin, deferipron ve deferasiroksdur. Yapılan çalışmalarda bu ilaçların kardiyak ve karaciğer demiri üzerinde etkili olduğu ve bu sistemlere biriken demiri şelatlayarak organ disfonksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Deferipron özellikle retiküloendotelial sistemdeki demiri uzaklaştırırken, deferasiroksun hepatik demire daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (85,92). Bununla birlikte şelasyon tedavileri tamamıyla masum tedaviler değildir. Özellikle pediatrik popülasyonda büyüme gelişme, endokrin sistem üzerine yan etkileri bulunmaktadır. Bu durumda özellikle bu hasta grubunda şelasyon amaçlı alınan tedaviler ne kadar etkin düzenlenebilir ve doz aşımaları hızlı görülüp hızlı müdahale edilebilirse hastaların bu yan etkilere maruz kalma sıklığı azaltılabilir. Bizim sonuçlarımız, şelasyon tedavisi alan ve almayan hastalarda tedaviye başlama kararı ve

doz ayarlaması için ferritine kıyasla daha hızlı müdahale edilebilmesinin önünü açmaktadır. Bunun yanında şelasyon amaçlı ilaç kullanımı olan hastalarda ferritin ortancası 1618 µg/L iken ilaç kullanımı olmayanlarda 1483 µg/L olduğu görülmektedir. Bu sonuç ferritin düzeyi izleminin ilaç kullanımı ve dozuyla ilgili net bilgi veremeyeceğini ortaya koymaktadır. Bizim gerçekleştirdiğimiz basit ve pratik yöntemin şelasyon tedavisinin etkinliği hakkında bilgi verebileceği öngörülmektedir.

Bizim bu çalışmadaki kısıtlılıklarımız öncelikle talasemi hastalarının rutin izlemlerinden gelen numunesi kullanıldığı için ve bu hastalara serum demir ölçümü yapılmadığı için serum demir değerleri elimizde bulunmamaktadır. Hastaların serum demirleri de ölçülebilseydi hemoglobin başına düşen demir düzeyiyle arasında ilişki olup olmadığını değerlendirebilirdik. Bu ölçüm sadece sağlıklı kontrol grubunda yapılabilmıştır. Bir diğer kısıtlılık, literatürdeki birçok yayın kararsız demir formunu oksidatif stres parametreleriyle ilişkilendirmiş ve birlikte değerlendirmişlerdir. Talasemi hastalarındaki hematolojik bozukluk sürecinde eritrosit içinde de oksidatif stresin artmış olması kaçınılmazdır. Bunun yanında ilaç kullanan ve kullanmayan hastaları karşılaştırırken hasta sayımızın az olması nedeniyle sadece deferipron kullanan ve deferipron+deferasiroks kullanan hastaların eritrosit içi demir düzeyleri karşılaştırılamamıştır. Daha fazla örneklem büyüklüğüyle her bir ilacın ve ilaç kullanmayan grubun hemoglobin başına düşen demir düzeyleri karşılaştırılabilir.

6. SONUÇLAR

Sonuçlarımız talasemi hastalarında kalp, karaciğer gibi organlarda biriken demirin eritrositlerde de biriktiğini göstermektedir. Demir birikiminin eritrositlerde gösterilmesiyle birlikte ferritin gibi uzun dönemde artan-azalan ve demir birikiminin değişimini direkt olarak yansıtamayan bu parametrenin aksine demir yükünü direkt hücre düzeyinde belirleyebilen eritrosit içi non-hem demir düzeyi ölçülmesinin önünü açmıştır. Demir vücutta özellikle bağlı olmadığı formlarda tehlikelidir, eritrosit içi non-hem demir de demirin hemoglobine bağlı olmayan formunu ölçerek vücuttaki potansiyel zararlı form hakkında bilgi vermektedir. Çalışmamız literatürle de uyumlu sonuçlar içermektedir. Önceden flow sitometri ve HPLC yöntemleriyle tespit edilen eritrosit içi demir düzeyi bizim çalışmamızda kolorimetrik yöntemle ucuz, hızlı, basit bir şekilde ölçülmüştür.

Eritrosit içi non-hem demirin bu hastalarda ölçülmesi ve şelasyon amaçlı kullanılan ilaçla da ilişkilendirilebiliyor olması; bu hastalarda yaşam kalitesini artırmak, demir şelasyon tedavi dozlarına daha hızlı ve etkin müdahale edebilmek için bu parametrenin tıp alanında kullanılmasının ve yenilikçi çalışmalar yapılmasının önünü açmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Abbasi U, Abbina S, Gill A, Bhagat V, Kizhakkedathu JN. A facile colorimetric method for the quantification of labile iron pool and total iron in cells and tissue specimens. *Sci Rep.* 2021;11(1):6008. doi: 10.1038/s41598-021-85387-z.
2. Nairz M, Weiss G. Iron in infection and immunity. *Mol Aspects Med.* 2020;75:100864. doi: 10.1016/j.mam.2020.100864.
3. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem.* 2004;331(2):370–5. doi: 10.1016/j.ab.2004.03.049.
4. Chutvanichkul B, Vattanaviboon P, Mas-oodi S, U-pratya Y, Wanachiwanawin W. Labile iron pool as a parameter to monitor iron overload and oxidative stress status in β -thalassemic erythrocytes. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(4):631–6. doi: 10.1002/cyto.b.21633.
5. Prus E, Fibach E. The labile iron pool in human erythroid cells. *Br J Haematol.* 2008;142(2):301–7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07192.x.
6. Natalia Rybkowska, Strzelak K, Koncki R. A comparison of photometric methods for serum iron determination under flow analysis conditions. *Sens Actuators B Chem.* 2018;254:307–13. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.059>.
7. Farmakis D, Porter J, Taher A, Cappellini MD, Angastiniotis M, Eleftheriou A. 2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia. *Hemasphere.* 2022;6(8):e732. doi: 10.1097/HS9.0000000000000732.
8. Türk Hematoloji Derneği. “Ulusal Tedavi Kılavuzu 2011 Beta Talasemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu” VIII. Bölüm. 2011.
9. Prus E, Fibach E. Effect of iron chelators on labile iron and oxidative status of thalassaemic erythroid cells. *Acta Haematol.* 2010;123(1):14–20. doi: 10.1159/000258958.
10. Nilsson UA, Bassen M, Sävman K, Kjellmer I. A simple and rapid method for the determination of ‘free’ iron in biological fluids. *Free Radic Res.* 2002;36(6):677–84. doi: 10.1080/10715760290029128.
11. Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(2):277–87. doi: 10.1016/j.beha.2004.10.003.

12. Pootrakul P, Breuer W, Sametband M, Sirankapracha P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded β -thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood*. 2004;104(5):1504–10. doi: 10.1182/blood-2004-02-0630.
13. Buonocore G, Zani S, Sargentini I, Gioia D, Signorini C, Bracci R. Hypoxia-induced free iron release in the red cells of newborn infants. *Acta Paediatr*. 1998;87(1):77-81. doi: 10.1080/08035259850157912.
14. Marek Babušiak. *The Biochemistry of Zinc and Iron- Thesis*. 2007.
15. Roemhild K, Maltzahn FV, Weiskirchen R, Knüchel R, Stillfried SV, Lammers T. Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2021;42(8):640–56. doi: 10.1016/j.tips.2021.05.001.
16. Higgins T, Eckfeldt JH, Barton JC, Doumas BT. Hemoglobin, Iron and Bilirubin. In: Tietz. 8th ed. Chapter 32. 2018. 985–1030.
17. Silva AMN, Rangel M. The (Bio)Chemistry of Non-Transferrin-Bound Iron. *Molecules*. 2022;27(6):1784. doi: 10.3390/molecules27061784.
18. Wikipedia. Iron-binding proteins. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Iron-binding_proteins. Access date: 5 Ağustos 2024.
19. Wikipedia. Non-heme iron protein. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Non-heme_iron_protein. Access date: 5 Ağustos 2024.
20. Kaplan J, Ward DM. The essential nature of iron usage and regulation. *Curr Biol*. 2013;23(22):2325. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.059.
21. Coates ML. Hemoglobin function in the vertebrates: an evolutionary model. *J Mol Evol*. 1975;6(4):285–307. doi: 10.1007/BF01794636.
22. Ems T, St Lucia K, Huecker MR. *Biochemistry, Iron Absorption*. 2023 Apr 17. PMID: 28846259.
23. Uysal Z. Hepsidin ve Demir Metabolizması. *Türk Hematoloji Derneği- İlk Basamak Kursu*.
24. Piskin E, Cianciosi D, Gulec S, Tomas M, Capanoglu E. Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods. *ACS Omega*. 2022;7(24):20441–56. doi: 10.1021/acsomega.2c01833.
25. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):264–81. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.09.

26. Correnti M, Gammella E, Cairo G, Recalcati S. Iron Absorption: Molecular and Pathophysiological Aspects. *Metabolites*. 2024;14(4):228. doi: 10.3390/metabo14040228.
27. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*. 2004;116(4):565–76. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00130-8.
28. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev*. 2016;37(2):51–62. PMID: 28303071.
29. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*. 2005;37(11):1264–9. doi: 10.1038/ng1658. Epub 2005 Oct 16.
30. Zhou ZD, Tan EK. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):75. doi: 10.1186/s13024-017-0218-4.
31. Wikipedia. Human iron metabolism. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_iron_metabolism. Access date: 5 August 2024.
32. Kragh-Hansen U, Vorum H. Quantitative analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin. *Clin Chem*. 1993;39(2):202–8. PMID: 8432006.
33. Vorum H, Fisker K, Otagiri M, Pedersen AO, Kragh-Hansen U. Calcium ion binding to clinically relevant chemical modifications of human serum albumin. *Clin Chem*. 1995;41(11):1654–61. PMID: 7586558.
34. Loban A, Kime R, Powers H. Iron-Binding Antioxidant Potential of Plasma Albumin. *Clin Sci*. 1997;93(5):445–51. doi: 10.1042/cs0930445.
35. Xu X, Zhang L, Shen D, Wu H, Liu Q. Oxygen-dependent Oxidation of Fe(II) to Fe(III) and Interaction of Fe(III) with Bovine Serum Albumin, Leading to a Hysteretic Effect on the Fluorescence of Bovine Serum Albumin. *J Fluoresc*. 2008;18(1):193–201. doi: 10.1007/s10895-007-0263-4.
36. Nie G, Sheftel AD, Kim SF, Ponka P. Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. *Blood*. 2005;105(5):2161–7. doi: 10.1182/blood-2004-07-2722.
37. Pfeiffer CM, Looker AC. Laboratory methodologies for indicators of iron status: strengths, limitations, and analytical challenges. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(6):1606–14. doi: 10.3945/ajcn.117.155887.

38. Worwood M, May AM, Bain BJ. 9- Iron Deficiency Anaemia and Iron Overload. In: Dacie and Lewis Practical Haematology. (Twelfth Edition). 2017. p. 165–86.
39. Ma Y, Podinovskaia M, Evans PJ, Emma G, Schaible UE, Porter J, et al. A novel method for non-transferrin-bound iron quantification by chelatable fluorescent beads based on flow cytometry. *Biochem J.* 2014;463(3):351–62. doi: 10.1042/BJ20140795.
40. Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci.* 2000;23(3):185–92. doi: 10.1016/s0955-3886(00)00087-4.
41. Lee DH, Liu DY, Jacobs DR Jr, Shin HR, Song K, Lee IK, et al. Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(5):1090–5. doi: 10.2337/diacare.2951090.
42. Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Moorkens G, De Block C, Manuel-y-Keenoy B. Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(10):1749–55. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.010.
43. Leoncini S, Rossi V, Signorini C, Tanganelli I, Comporti M, Ciccoli L. Oxidative stress, erythrocyte ageing and plasma non-protein-bound iron in diabetic patients. *Free Radic Res.* 2008;42(8):716–24. doi: 10.1080/10715760802317655.
44. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes.* 2002;51(8):2348–54. doi: 10.2337/diabetes.51.8.2348.
45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Iron deficiency--United States, 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002 Oct 11;51(40):897-9. PMID: 12418542.
46. Ramsay AJ, Hooper JD, Folgueras AR, Velasco G, López-Otín C. Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica.* 2009;94(6):840–9. doi: 10.3324/haematol.2008.001867.
47. Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M, et al. Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood.* 2009;113(22):5605–8. doi: 10.1182/blood-2008-12-195594.
48. Chinnery PF, Crompton DE, Birchall D, Jackson MJ, Coulthard A, Lombès A, et al. Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation. *Brain.* 2007;130(Pt 1):110–9. doi: 10.1093/brain/awl319.

49. Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 29-35,507. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.29.
50. Burn J, Chinnery PF. Neuroferritinopathy. *Semin Pediatr Neurol*. 2006;13(3):176–81. doi: 10.1016/j.spn.2006.08.006.
51. Nittis T, Gitlin JD. Role of copper in the proteasome-mediated degradation of the multicopper oxidase hephaestin. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25696–702. doi: 10.1074/jbc.M401151200.
52. Schulz JB, Boesch S, Bürk K, Dürr A, Giunti P, Mariotti C, et al. Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(4):222–34. doi: 10.1038/nrneuro.2009.26.
53. Roetto A, Bosio S, Gramaglia E, Barilaro MR, Zecchina G, Camaschella C. Pathogenesis of hyperferritinemia cataract syndrome. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):532–5. doi: 10.1006/bcmd.2002.0590.
54. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RT, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):2539–43. doi: 10.1073/pnas.92.7.2539.
55. Nittis T, Gitlin JD. The copper-iron connection: hereditary aceruloplasminemia. *Semin Hematol*. 2002;39(4):282–9. doi: 10.1053/shem.2002.35633.
56. Takahashi Y, Miyajima H, Shirabe S, Nagataki S, Suenaga A, Gitlin JD. Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet*. 1996;5(1):81–4. doi: 10.1093/hmg/5.1.81.
57. Fellman V. The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):444–50. doi: 10.1006/bcmd.2002.0582.
58. Gregory A, Hayflick SJ. Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Folia Neuropathol*. 2005;43(4):286–96. PMID: 16416393.
59. Beutler E, Gelbart T, Lee P, Trevino R, Fernandez MA, Fairbanks VF. Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood*. 2000;96(13):4071–4. PMID: 11110675.
60. Knisely AS, Gelbart T, Beutler E. Molecular characterization of a third case of human atransferrinemia. *Blood*. 2004;104(8):2607. doi: 10.1182/blood-2004-05-1751.
61. Bolayırılı İM. Demir ve ilişkili hematolojik bozukluklar. Kan hastalıklarına biyokimyasal ve laboratuvar yaklaşım. 2022. s 169-187.


62. Biswas S, Smrity SZ, Bhuia MdS, Sonia FA, Aktar MstA, Chowdhury R, et al. Beta-Thalassemia: A Pharmacological Drug-Based Treatment. *Drugs and Drug Candidates*. 2024;3(1):126–47. <https://doi.org/10.3390/ddc3010008>.
63. Türk Hematoloji Derneği. Akdeniz anemisi (beta talasemi) taşıyıcılığı ve hastalığı. Erişim sayfası: https://www.thd.org.tr/thd_halk/?sayfa=akdeniz_anemisi. Erişim tarihi: 23.07.2024.
64. Porter D, Taher J. 2021 Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (tdt) publishers thalassaemia international federation 4th edition. 2021.
65. Angastiniotis M, Lobitz S. Thalasseмии: An overview. *Int J Neonatal Screen*. 2019;5(1):16. doi: 10.3390/ijns5010016.
66. Ask Hematologist/ Understand Hematology. Thalassaemias. Available from: <https://askhematologist.com/thalasseмии/>. Access date: 11.12.2024.
67. Sağlık hizmetleri genel müdürlüğü. Talasemi tanı ve izlem rehberi. 2022.
68. EP07-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition A guideline for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process [Internet]. 2005. Available from: www.clsi.org.
69. Huennekens FM, Caffrey RW, Basford RE, Gabrio BW. Erythrocyte metabolism. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. *J Biol Chem*. 1957;227(1):261-72. PMID: 13449071.
70. Artiss JD, Vinogradov S, Zak B. Spectrophotometric Study of Several Sensitive Reagents for Serum Iron. *Clin. Biochem*. 1981;14(6):311-5. doi: 10.1016/s0009-9120(81)91065-1.
71. Carter P. Spectrophotometric Determination of Serum Iron at the Submicrogram Level with a New Reagent (Ferrozine). *Anal Biochem*. 1971;40(2):450-8. doi: 10.1016/0003-2697(71)90405-2.
72. Demir_2 (IRON_2) [package insert]. Available from: www.siemens.com/diagnostics.
73. C61-A Determination of Serum Iron, Total Iron-Binding Capacity and Percent Transferrin Saturation; Approved Standard A standard for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process [Internet]. 1998. Available from: www.clsi.org.
74. Topic E, Nikolac N, Panteghini M, Theodorsson E, Salvagno GL, Miler M, et al. How to assess the quality of your analytical method? *Clin Chem Lab Med*. 2015 Oct 1;53(11):1707–18. doi: 10.1515/cclm-2015-0869.

75. Chesher D. Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem Rev.* 2008;29:S23-6. PMID: 18852851.
76. Yücel D. Pratik Metot Validasyonu ve Verifikasyonu. *Türk Biyokimya Derneği.* 2014.
77. Chaichompoo P, Qillah A, Sirankapracha P, Kaewchuchuen J, Rimthong P, Paiboonsukwong K, et al. Abnormal red blood cell morphological changes in thalassaemia associated with iron overload and oxidative stress. *J Clin Pathol.* 2019;72(8):520–4. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205775.
78. Steinbicker AU, Muckenthaler MU. Out of balance--systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients.* 2013;5(8):3034–61. doi: 10.3390/nu5083034.
79. Shinar E, Rachmilewitz EA. Haemoglobinopathies and red cell membrane function. *Baillieres Clin Haematol.* 1993;6(2):357–69. doi: 10.1016/s0950-3536(05)80150-7.
80. Chutvanichkul B, Vattanaviboon P, Mas-Oodi S, U-Pratya Y, Wanachiwanawin W. Erythrocyte labile iron pool indicating concealed iron overload in non-transfusion-dependent β -thalassemia. *Turk J Biochem.* 2024;49(2):178–86. <https://doi.org/10.1515/tjb-2023-0116>.
81. Morales NP, Rodrat S, Piromkraipak P, Yamanont P, Paiboonsukwong K, Fucharoen S. Iron chelation therapy with deferiprone improves oxidative status and red blood cell quality and reduces redox-active iron in β -thalassaemia/hemoglobin E patients. *Biomed Pharmacother.* 2022;145:112381. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112381.
82. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *Int Immunol.* 2017;29(9):401–9. doi: 10.1093/intimm/dxx031.
83. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(1):141–9. doi: 10.1093/ndt/gfg493.
84. Ali M, Yassin MA, Aldeeb M. Iron Overload in a Patient with Non-Transfusion-Dependent Hemoglobin H Disease and Borderline Serum Ferritin: Can We Rely on Serum Ferritin for Monitoring in This Group of Patients? *Case Rep Oncol.* 2020;13(2):668–73. doi: 10.1159/000507653.
85. Hider RC, Hoffbrand AV. The Role of Deferiprone in Iron Chelation. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2140–50. doi: 10.1056/NEJMra1800219.
86. Wang WC, Ahmed N, Hanna M. Non-transferrin-bound iron in long-term transfusion in children with congenital anemias. *J Pediatr.* 1986;108(4):552–7. doi: 10.1016/s0022-3476(86)80832-0.

87. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*. 2003;102(7):2670–7. doi: 10.1182/blood-2003-03-0807.
88. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):403–10. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.014.
89. Piga A, Longo F, Duca L, Roggero S, Vinciguerra T, Calabrese R, et al. High nontransferrin bound iron levels and heart disease in thalassemia major. *Am J Hematol*. 2009;84(1):29–33. doi: 10.1002/ajh.21317.
90. Jatavan P, Sekararithi R, Jaiwongkam T, Kumfu S, Chattipakorn N, Tongsong T. Comparisons of serum non-transferrin-bound iron levels and fetal cardiac function between fetuses affected with hemoglobin Bart's disease and normal fetuses. *Front Med (Lausanne)*. 2023;9:1015306. doi: 10.3389/fmed.2022.1015306.
91. Hedayati M, Abubaker-Sharif B, Khattab M, Razavi A, Mohammed I, Nejad A, et al. An optimised spectrophotometric assay for convenient and accurate quantitation of intracellular iron from iron oxide nanoparticles. *Int J Hyperthermia*. 2018;34(4):373–81. doi: 10.1080/02656736.2017.1354403.
92. Wood JC, Otto-Duessel M, Gonzalez I, Aguilar MI, Shimada H, Nick H, et al. Deferasirox and deferiprone remove cardiac iron in the iron-overloaded gerbil. *Transl Res*. 2006;148(5):272–80. doi: 10.1016/j.trsl.2006.05.005.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Bilkent Şehir Hastanesi

I NOLU
TIBBİ ARAŞTIRMALAR BİLİMSEL VE ETİK DEĞERLENDİRME KURULU
(TABED) BAŞKANLIĞINA

Sayı : TABED 1-24- 642

642 -no'lu çalışma

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği'nde yapılması planlanan
"Talasemi Hastalarının Hemolizatlarında Hemoglobine Bağlı Olmayan Demir Birikiminin
Değerlendirilmesi" konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliğiyle uygun
görülmüştür.

23/10/2024

Etik Kurul Sekreterliği Üniversiteler Mah. Bilkent Cad. No:1 Çankaya/Ankara
Tel: 0 (312) 552 66 00 Dahili : 772 998 / 772 999