



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ VE β TALASEMİ MİNÖRDE ISI
ŞOK PROTEİNLERİ**

Hasan ULUSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

Gaziantep
2015



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ VE β TALASEMİ MİNÖRDE ISI
ŞOK PROTEİNLERİ**

Hasan ULUSAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

Gaziantep
2015

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ VE β TALASEMİ MİNÖRDE ISI ŞOK
PROTEİNLERİ

Hasan ULUSAL

Tez Savunma Tarihi: 18.06.2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmamın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

Yrd. Doç. Dr. Nurdan ÖZLÜ CEYLAN

İmzası

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olup tezin planlanması ve yazım aşamasında etik dışı davranışım olmayıp, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettim. Bu tez çalışmasında elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edecek herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

08.06.2015

Hasan ULUSAL

TEŞEKKÜR

Bu araştırmamın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışmanım Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU'na, Prof. Dr. Seyithan TAYSI'ya, Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENCİ'ye, Prof. Dr. Maher ALMOKDAD'a, Doç. Dr. Ş. Nur AKSOY'a ve Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK'e teşekkür ederim.

Tezimin klinik çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Ali BAY'a, yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Doç. Dr. Emine S. NAMIDURU'ya ve istatistiksel çalışmalarına yardımcı olan Doç. Dr. Seval KUL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca her türlü yardımlarını benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Yeter ÇAKMAK'a, Arş. Gör. Dr. Esra ÇELİK'e ve Arş. Gör. Dr. Mehmet ERTEN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi yardımlarıyla yanımda olan Ecz. Mahmut KARAYAĞMURLU'ya, Ecz. Ümmü Gülsüm AKSOY'a, Arş. Gör. Mehmet BOSTANCIKLIOĞLU'na ve bölüm sekreteri Öznur DOĞAN BARIŞ'a teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca aynı sırayı paylaştığım ve hem yüksek lisans çalışmalarında hem de her türlü konuda bana yardımcı olan en yakın arkadaşım, meslektaşım ve ablam olan Yüksek Kimyager Fatma ULUSAL'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi fedakarlıkları ile bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve eğitim hayatım boyunca her konuda destek olan babam Mehmet Faik ULUSAL'a, annem Halime ULUSAL'a, kardeşlerim Tefik ULUSAL, Hacı ULUSAL ve Mesut ULUSAL'a ve tez çalışmam sırasında her türlü yardımda bulunan nişanım Merve KELLEBOZ'a ve ailesine teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.13.28 numaralı proje ile ve Gaziantep Üniversitesi ÖYP Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca "2210-Yurt içi Lisans Üstü Burs Programı" kapsamında beni bursiyeri olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Anemilere Genel Bakış	5
2.1.1. Anemi tanımı	5
2.1.2. Anemilerin Sınıflandırılması	6
2.2. Anemilerin Ayırıcı Tanısı	8
2.2.1. Hipokrom mikrositik anemiler	8
2.3. Demir Eksikliği Anemisi.....	9
2.3.1. Demir metabolizması.....	9
2.3.2. Demir eksikliği anemisi ve tanımı	11
2.3.3. Demir eksikliği anemisi nedenleri	12
2.3.4. Demir eksikliği anemisinde klinik bulgular	14
2.3.5. Demir eksikliği anemisinde laboratuvar bulguları ve tanı.....	15
2.4. Talasemiler	16
2.4.1. Hemoglobin	16
2.4.2. Talasemilere genel yaklaşım.....	16
2.4.3. β talasemi minör	18
2.4.4. Mikrositer anemilerde ayırıcı tanı	18
2.5. Isı Şok Proteinleri.....	19
2.5.1. Moleküler şaperonlar	19
2.5.2. Isı şok proteinleri tanımı ve sınıflandırılması	20

2.5.3. Isı şok proteini 60	21
2.5.4. Isı şok proteini 70	24
2.5.5. Isı şok proteini 90	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1. Materyal ve Yöntem.....	36
3.2. Dışlama Kriterleri.....	37
3.3. Parametrelerin Ölçülmesi.....	37
3.3.1. Rutin analizler.....	37
3.3.2. Isı şok proteini 60	38
3.3.3. Isı şok proteini 70	38
3.3.4. Isı şok proteini 90	39
3.3.5. Hepsidin	39
3.3.6. Eritropoetin	39
3.4. İstatiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Bulgular	41
5. TARTIŞMA	49
6. KAYNAKLAR	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

cHsp70	Sitozolik ısı şok proteini 70
CRP	C reaktif protein
DDBK	Doymamış demir bağlama kapasitesi
DEA	Demir Eksikliği Anemisi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent yöntem
EPO	Eritropoietin
ER	Endoplazmik Retikulum
Grp	Glukoz düzenleyici protein
Hb	Hemoglobin
Hb F	Fetal hemoglobin
HIF-1 α	Hipoksiyle uyarılan faktör 1 alfa
Hsp	Isı şok proteinleri
Htc	Hemotokrit
IDA	Iron Deficiency Anemia
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi
mt-Hsp60	Mitokondriyal Hsp60
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B

NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
RBC	Kırmızı kan hücresi
RDW	Eritrosit hücre dağılım genişliği
rhEPO	Rekombinant insan eritropoietini
SS	Standart sapma
SEP	Serbest eritrosit protoporfirini
sTfR	Çözünür transferrin reseptörü
TDBK	Total demir bağlama kapasitesi
TNF- α	Tümör nekroz faktörü α
TS	Transferrin saturasyonu
WBC	Beyaz kan hücresi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Isı şok proteinlerini uyaran faktörler.....	21
Şekil 2: Hsp70 ailesinin molekül yapısı.....	25
Şekil 3: Hsp70 için protein katlanma mekanizması.....	27
Şekil 4: Hsp70 tarafından etkilenen kanser ilişkili yollar.....	29
Şekil 5: Hsp60 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	44
Şekil 6: Hsp70 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	44
Şekil 7: Hsp90 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	45
Şekil 8: Hepsidin düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	45
Şekil 9: EPO düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Çocuklarda yaşa göre ortalama hematolojik değerler.....	6
Tablo 2: Anemilerin etiyolojik sınıflandırılması.....	6
Tablo 3: Anemilerin morfolojik sınıflandırılması.....	7
Tablo 4: İnsan vücudundaki demir dağılımı.....	9
Tablo 5: İnfant ve genç çocuklarda (5 yaşından küçük) anemi prevalansı.....	12
Tablo 6: Demir eksikliği anemisi nedenleri.....	13
Tablo 7: Demir eksikliği anemisi tanısı için gerekli testler.....	15
Tablo 8: Yaygın görülen mikrositer anemilerin karşılaştırılması.....	19
Tablo 9: Ökaryotlarda bulunan temel Hspler.....	22
Tablo 10: Hsp70 ailesi üyeleri.....	25
Tablo 11: Çalışma gruplarının demografik verileri.....	41
Tablo 12: Çalışma gruplarına ait tam kan sayım sonuçları.....	42
Tablo 13: Çalışma gruplarının rutin biyokimya, hormon ve CRP sonuçları.....	42
Tablo 14: Çalışma gruplarının Hsp60, Hsp70, Hsp90, EPO ve hepsidin sonuçları...43	
Tablo 15: Demir eksikliği anemisi grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi.....	46
Tablo 16: β talasemi minör grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi.....	47
Tablo 17: Kontrol grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi.....	48

ÖZET

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ VE β TALASEMİ MİNÖRDE ISI ŞOK PROTEİNLERİ

Hasan ULUSAL

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

Haziran 2015, 64 sayfa

Isı şok proteinleri tüm ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunan moleküler şaperon işlevi olan bir protein grubudur. Büyüme faktörlerinin bulunmaması, hipoksi, DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, hücre ölümü sinyalleri, toksik ve oksidatif stres Hsp ifadesini artırır. Bu çalışmada her ikisi de hipokrom mikrositer anemiler olan DEA ve β talasemi minörde ve sağlıklı gruplarda EPO ekspresyon ve/veya salınımında teorik olarak ilişkisi bulunan Hsplerin düzeylerinin araştırılması ve EPO ve hepsidin düzeyleri ile olası ilişkilerinin gösterilmesi amaçlandı. Bu çalışmada DEA olan 84 çocuk, β talasemi minörlü 20 ila yaş ve cinsiyet uyumlu 45 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. Kan örneklerinde Hsp60, Hsp70, Hsp90, EPO ve hepsidin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Üç grup arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,051$). Hsp60, DEA grubunda β talasemi minör ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulundu. Hsp90, DEA grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. EPO DEA ve β talasemi minör grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulundu. Hsp70 ve hepsidin düzeyleri hasta-kontrol grupları arasında farklılık göstermemektedir. Hsp60 ve Hsp90 düzeylerinin EPO düzeylerinden bağımsız olarak DEA'de yüksek olmasından dolayı düzenlemenin hipoksi ve aneminin derecesi ile değil demir eksikliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Hsp60'ın apoptotik özellikleri iki anemi grubu arasındaki RBC sayı farkına etkili bir faktör olabilir.

Anahtar Sözcükler: β talasemi minör, Demir eksikliği anemisi, Isı şok proteini 60, Isı şok proteini 70, Isı şok proteini 90

ABSTRACT

HEAT SHOCK PROTEINS IN IRON DEFICIENCY ANEMIA AND β THALASSEMIA MINOR

Hasan ULUSAL

Master Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Professor Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

June 2015, 64 pages

Heat shock proteins, found in all eukaryotic and prokaryotic cells, are a group of proteins, has molecular chaperone function. Hypoxia, DNA damage, cytotoxic drugs, cell death signals, toxicity, oxidative stress and absence of growth factors may lead to increased expression of Hsp. In the present study, it was aimed to investigate the levels of Hsp theoretically related with EPO expression and/or secretion and the relationship between hepcidin levels and EPO in the patients with IDA and β -thalassemia minor which both are hypochromic microcytic anemia and healthy group. 84 children with IDA, 20 children with β -thalassemia minor and 45 healthy children matched in terms of age and sex were included to the present study. The levels of Hsp60, Hsp70, Hsp90, EPO and hepcidin were measured by ELISA method. Significant difference was not recorded among three groups in terms of age and gender ($p > 0.051$). Hsp60 was higher in the IDA group compared to the β -thalassemia minor and control groups. Hsp90 was significantly higher in IDA compared to the control group. EPO was higher in IDA and β -thalassemia minor groups compared to the control group. Hsp70 and hepcidin levels did not differ between patients and control group. It is thought that regulation of Hsp70 and Hsp90 aren't associated with the degree of hypoxia and anemia, they are associated with iron deficiency because Hsp60 and Hsp70 levels are higher independently EPO levels in IDA. Apoptotic properties of Hsp60 can be an effective factor for RBC count difference between two groups of anemia.

Keywords: β -thalassemia minor, Iron deficiency anemia, Heat shock protein 60, Heat shock protein 70, Heat shock protein 90

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Demir eksikliği vücut demirinin hemoglobin (Hb) yapımını engellemeyecek düzeyde eksik olması, demir eksikliği anemisi (DEA) ise demir eksikliği sonucu Hb miktarının azalması olarak tanımlanabilir (1). DEA başka bir ifadeyle; Hb konsantrasyonunun yaşa ve cinsiyete göre 2 standart sapmanın (SS) altında olması şeklinde tanımlanabilir (2).

Demir eksikliği anemisi gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerin en büyük sağlık sorunlarından biridir. Çocuklarda mental, motor ve kognitif fonksiyonları etkiler ve tedavi edilmediğinde gelişim basamaklarında ve zeka puanlarında kalıcı düşmeye neden olabilir (3). Dünya genelinde bilimsel ve ekonomik gelişmelere rağmen dünya popülasyonunun nerdeyse çeyreği anemidir. WHO'nun tahminlerine göre dünya genelinde hamile kadınların %42 si, 15-50 yaş arası hamile olmayan kadınların %30 u, okul öncesi çocukların %47 ve erkeklerin %12,7 si anemidir. Demir eksikliği anemisi dünya genelinde anemilerin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. WHO verilerine göre 2004 yılında DEA yüzünden 273 bin ölüm gerçekleşti (4).

Türkiye'de 2003-2008 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı bir çalışmada 6-24 aylar arasındaki bebeklerde DEA sıklığı %12-46 arasında bulunmuştur (2). 2004 yılında yapılan başka bir çalışmada ise DEA sıklığı 6-12 aylık çocuklarda %7,8 saptanmıştır (3). Elazığ'da 4 ay-18 yaş arası çocuklarda yapılan çalışmada DEA sıklığı %12,7 olarak saptanmıştır (5). Bursa'da sosyoekonomik düzeyi düşük bir bölgede yapılan çalışmada 2-6 yaş arası çocuklarda DEA %7,4 olarak bulunmuştur (6). Erzurum'da yapılan bir çalışmada ise 6 ay-6 yaş arası çocuklarda DEA %6,5 olarak saptanmıştır (7).

Talasemiler bir veya daha fazla globulin zincirinin sentezinde azalma veya yokluğuyla tanımlanan otozomal resesif geçişli kalıtsal Hb bozukluklarıdır (8). β talasemi minör β globulin genlerinden birinin sentezlenmemesi veya sentezinde azalma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (9). β talasemi taşıyıcılığı sıklığının dünya genelinde %1,5 yaklaşık 80 milyon olduğu düşünülmektedir (10-11). Türkiye'de yapılan bir çalışmada β talasemi taşıyıcılığı %2,1 olarak bulunmuştur. Marmara, Ege ve Akdeniz bölgesinde yapılan tarama sonucunda ise ortalama talasemi taşıyıcılığı %4,3 bulunmuştur (12).

Isı şok proteinleri (Hsp) ısıyla uyarılan proteinler olarak bilinen bir protein sınıfıdır (13). İfadesi birçok çevresel ve fizyolojik strese yanıt olarak uyarılır (14). Hsp ler en bol bulunan intraselüler proteinlerdendir ve normal fizyolojik şartlarda ifadesi düşüktür (13). Ancak büyüme faktörlerinin bulunmayışı, hipoksi, DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar gibi hücre ölümü sinyalleri Hsp ifadesini çok fazla artırır (14). Artan Hsp ifadesi hücrenin kanser gibi ölümcül koşullarda hayatta kalımını sağlar (15).

Isı şok proteinlerinin birincil görevi moleküler şaperon olmasıdır. Hspler diğer hücresel proteinlerin katlanmasını sağlar ve proteinlerin kümeleşmesini önler (13). Hsplerin en önemli fonksiyonlarından biri de güçlü anti apoptotik proteinler olmasıdır. Apoptosis mekanizmasında apoptotik proteinler ile etkileşerek apoptosizi önler (13,16).

Eritropoietin (EPO) eritrositlerin apoptoza benzer intihar eylemi olan eritroptozdan koruyucu etki gösterir. DEA'de ise yüksek eritropoietin düzeylerine rağmen eritroptoz artmıştır. Çeşitli çalışmalarda demir eksikliğinin rekombinant insan eritropoietini (rhEPO) tedavisinin etkinliğinin azalttığı gösterilmiştir (17)

Demir eksikliği anemisi Türkiye ve Dünya genelinde prevalansı yüksek olan ölümler dahi sonuçlanabilen bir hastalıktır (4). DEA hipoksi ile seyreden ve artmış apoptosiz ile karakterize bir hastalıktır (17-18). Hspler hipoksi ile uyarılan anti apoptotik bir protein ailesidir. DEA ile ilgili çok fazla çalışma mevcut olmasına rağmen DEA ile Hspler arasındaki ilişkiyi anlatan araştırmalar mevcut değildir. Yapılan bu araştırma DEA patogeneğinde Hsplerin rolünün gösterilmesine yöneliktir; DEA moleküler biyokimyası ve Hsp hücresel etkileri arasındaki çok sayıdaki bağlantı DEAdede beklenen aksine (hipoksinin Hsp sentezi için önemli bir uyarıcı olması) Hsplerin miktar veya etkilerinin oluşumunda yetersizlik olması hipotezine dayanmaktaydı. Bu çalışmada DEAdede EPO ekspresyon ve/veya salınımında teorik olarak ilişkisi bulunan Hsplerin düzeylerinin araştırılması ve EPO ve hepsidin düzeyleri ile ilişkilerinin gösterilmesi amaçlandı. β talasemi minörün bu çalışmaya dahil edilmesiyle her ikisi de hipokrom mikrositer anemiler olan DEA ve β talasemi minörde görülen eritrosit morfolojisi ve sayısındaki farklılıklara Hsp'nin direkt veya dolaylı etkisinin gösterilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anemilere Genel Bakış

2.1.1. Anemi tanımı

Anemi; Hb konsantrasyonunun, hematokrit (htc) değerinin veya her milimetre küpteki kırmızı kan hücrelerinin (RBC) sayısının normal değerinin altına inmesi olarak tanımlanır. Normal aralık için alt sınır normal popülasyonda yaş ve cinsiyete göre belirlenir (19). Çocuklarda yaşa göre normal Hb konsantrasyonunun 2 SS (%95 güven aralığında) altı anemi olarak kabul edilir (19). Çocuklarda yaşa göre hematolojik değerler Tablo 1’de verilmiştir (20).

Aneminin varlığı genellikle hastanın Hb değerinin yaşa ve cinsiyete özgü normal değerlerle karşılaştırılması ile tespit edilebilir. Irklar arasında farklılıklar olabilir (20). Siyanozlu kalp ya da pulmoner hastalıklar gibi patolojik durumlarda veya oksijene afinitesi yüksek olan Hb nedeniyle “normal sınırlar” içindeki Hb değerlerinde bile anemi görülebilir. Böyle durumlarda fizyolojik tanımlama yapmak daha uygundur. Aneminin en kolay tanımlanması; Hb ve htc değerlerinin o yaş ve cinsiyet için tanımlanan ortalamadan 2 SS aşağıda olmasıdır. Erkeklerde ergenlikten sonra yüksek androjen seviyeleri eritrosit yapımını arttırdığı için Hb düzeyleri daha yüksektir (21). Hb düzeyinin düşüşü kanda O₂ taşıma kapasitesinin azalmasına neden olur, bu düzey 7,8 g/dL nin altına inmeden önemli derecede fizyolojik değişiklikler görülmez. Bu değerinin altına inince; deri ve mukozada solukluk, kalp atım hacminde artma, taşikardi, dokulara daha kolay O₂ verilmesini sağlamak için Hb-oksijen disosiasyon eğrisinde sağa kayma ve kan akımında hayati organlara yönelme gibi fizyolojik değişiklikler anemiye uyum sağlamak için görülür. Hb seviyesindeki azalışın yanı sıra 2,3 difosfogliserat artışı görülür. Bu artış Hbnin O₂ ye afinitesini azaltır. Böylece O₂ Hbden daha kolay ayrılarak

dokulara geçebilir. Sebebi ne olursa olsun uzun süre devam eden ağır anemi taşikardi ve konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanır (22).

Tablo 1: Çocuklarda yaşa göre ortalama hematolojik değerler (20)

Yaş	Hemoglobin (g/dL)		Htc (%)		Eritrosit (x10 ³ /mm ³)		MCV(fL)	
	Ort.	-2SS	Ort.	-2SS	Ort.	-2SS	Ort.	-2SS
Kordon kanı	16.5	13.5	51	42	4.7	3.9	108	98
1-3 gün	18.5	14.5	56	45	5.3	4.0	108	95
1 hafta	17.5	13.5	54	42	5.1	3.9	107	88
2 hafta	16.5	12.5	51	39	4.9	3.6	105	86
1 ay	14.0	10.0	43	31	4.2	3.0	104	85
2 ay	11.5	9.0	35	28	3.8	2.7	96	77
3-6 ay	11.5	9.5	35	29	3.8	3.1	91	74
0,5-2 yıl	12.0	10.5	36	33	4.5	3.7	78	70
2-6 yıl	12.5	11.5	37	34	4.6	3.9	81	75
6-12 yıl	13.5	11.5	40	35	4.6	4.0	86	77
12-18 yıl kız	14.0	12.0	41	36	4.6	4.0	90	80
12-18 yıl erkek	14.5	13.0	43	37	4.9	4.5	88	78

MCV: Ortalama eritrosit hacmi

2.1.2. Anemilerin Sınıflandırılması

Çocukluk çağı anemi nedenleri 3 büyük grupta toplanabilir.

1. Eritrositlerin veya Hbnin yetersiz yapımına bağlı anemiler
2. Eritrositlerin aşırı yıkımına bağlı anemiler (hemolitik anemiler)
3. Kan kaybına bağlı anemiler

Anemiler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Anemilerin sınıflandırılmasında en sık kullanılan etiyolojik ve morfolojik sınıflandırmadır (19-20). Anemilerin etiyolojik sınıflandırılması Tablo 2’de verilmiştir (23).

Tablo 2: Anemilerin etiyolojik sınıflandırılması (23)

- A. Eritrosit veya Hb yapımındaki yetersizliğe bağlı anemiler
 1. Kemik iliğinde eritroid seri ana hücrelerinin sayısal yetersizliği
 2. Saf eritrositer anemiler
 3. Aplastik anemiler
 4. Normal sayıda eritroid seri ana hücresi olmasına karşın yetersiz yapım

5. Spesifik faktörlerin yetersizliği
6. Megaloblastik anemiler (folik asit eksikliği, B12 vitamin eksikliği)
7. Mikrositer anemiler (DEA, B6 vitamin eksikliği, kurşun zehirlenmesi)
8. Kemik iliği infiltrasyonu (lösemiler, lenfomalar, nöroblastom)

Tablo 2: Anemilerin etiyolojik sınıflandırılması (devam) (23)

B. Hemolitik Anemiler

Eritrosite özgü bozukluklar

1. Yapısal bozukluklar
2. Enzim bozuklukları
3. Hemoglobün sentezinde bozukluk

Eritrosit dışı nedenler

1. İmmün nedenler
2. İmmün olmayan nedenler

C. Kan Kaybına Bağlı Anemiler

1. Akut kanamalar
2. Kronik kanamalar

Anemilerin morfolojik sınıflandırılması ortalama eritrosit hacmine (MCV) göre yapılan sınıflandırmadır. MCV ye göre aneminin hipokromik mikrositik, normositik veya makrositik olduğu belirlenir (19-20). Anemilerin morfolojik sınıflandırılması Tablo 3'de verilmiştir (19-20).

Tablo 3: Anemilerin morfolojik sınıflandırılması (19-20)

Hipokrom mikrositik anemiler (MCV<70 fL)	Normositik (MCV 72-79 fL)	Makrositik anemiler (MCV>75 fL)
Demir eksikliği anemisi	Akut kan kaybı	B12 vitamin eksikliği
Talasemiler (α veya β)	Kronik böbrek yetmezliği	Folik asit eksikliği
Sideroblastik anemiler	Dalakta toplanma	Hereditör orotik asidüri
Kronik inflamasyon	Eritrosit enzim eksiklikleri	Tiyamine yanıtı anemi
Kurşun zehirlenmesi	Hemoglobün mutasyonları	Miyelodisplastik sendrom
Hemoglobün E taşıyıcılığı	Eritrosit zarı bozuklukları	Karaciğer hastalığı
Bakır eksikliği	Edinsel hemolitik anemiler	Fanconi aplastik anemi
	Hereditör hemolitik anemiler	Diamond-blackfan sendromu
		Hipotroidi
		Kemik iliği infiltrasyonu
		Artmış eritropoez
		Diseritropoetik anemi

2.2. Anemilerin Ayırıcı Tanısı

Anemiler morfolojik sınıflandırılmada MCV değerine göre 3 gruba ayrılmıştır (19-20).

1. Hipokrom mikrositik anemi
2. Makrositik anemi
3. Normositik anemi

2.2.1. Hipokrom mikrositik anemiler

Hipokrom mikrositik anemiler çocukluk çağında en sık görülen anemi tipidir. DEA ve talasemiler özellikle de β talasemi minör bu grupta en sık görülen anemilerdir (24). Türkiye’ de %2-3 kadar β talasemi minör hastasının bulunması hipokrom mikrositik anemi grubunun çok üyeli olmasına neden olur. Başlıca hipokrom mikrositik anemiler şunlardır (25).

1. Demir eksikliği anemisi
2. Kronik inflamasyon
3. Talasemiler
4. Kronik kurşun zehirlenmesi
5. Sideroblastik anemiler
6. Bakır eksikliği

Ortalama eritrosit hacmi değeri 70 fL den küçük olduğunda hipokrom mikrositer anemileri ayırt etmek için hastadan demir parametreleri ve Hb elektroforezi istenir. Demir parametreleri olarak genelde; serum demiri, transferin saturasyonu (TS), ferritin, total demir bağlama kapasitesi (TDBK) ve çözümlü transferrin reseptörü (sTfR) kullanılır (25).

Demir eksikliği anemili hastalarda talasemi veya enfeksiyonlarda bulunduğu tanı koymak zorlaşır. Demir eksikliği ile beraber enfeksiyon bulunduğu ferritin yerine

sTfR değerine bakılır. sTfR artmışsa bu demir eksikliği lehine yorumlanır. Demir eksikliği talasemi ile beraber olduğunda Hb elektroforezi demir tedavisi sonrasında tekrar edilmelidir. Çünkü Hb A₂ değeri düşmüş olabilir (25).

2.3. Demir Eksikliği Anemisi

2.3.1. Demir metabolizması

2.3.1.1. Demir

Demir vücutta birçok olaya katılan canlılar için önemli bir elementtir (26). Demir insan vücudunda +2 değerlikli ferröz (Fe²⁺) ve +3 değerlikli ferrik (Fe³⁺) formunda bulunabilir ve bu formlar arasında çok kolay geçiş yapabilir (27). Bu özelliği sayesinde demir, oksijen bağlayan birçok molekül ve enzim için değerli bir mineral haline gelir (28). Demirin en önemli fonksiyonu Hb yapısına girerek oksijen taşımaktır. Protoporfine bağlanarak Hb yapısına dahil olur (29). Demir ayrıca kas kütesinin büyümesi için miyoglobin sentezinde yer alır. Bunların dışında demir bazı enzimlerin (sitokrom, süperoksidad, katalaz, sitokrom oksidaz) sentezinde yer alır. Kullanılmayan demir ise ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır (1,30). İnsan vücudunda demirin dağılımı Tablo 4'de gösterilmiştir (1).

Tablo 4: İnsan vücudundaki demir dağılımı (1)

Vücutta demir içeren yapılar	Kadın	Erkek
Hemoglobin	1700 mg	2500 mg
Miyoglobin ve enzimler	300 mg	500 mg
Serum demir	3 mg	3 mg
Depo demir	0-200 mg	500-1000 mg

2.3.1.2. Ferritin

Ferritin 3000 kadar +3 değerlikli demir atomu içeren vücudun depo demiridir. İhtiyaç olduğu durumlarda hızlı bir şekilde çözünür. En çok kemik iliğindeki eritroid ana hücreler, makrofaj ve hepatositlerde olmak üzere tüm hücrelerde ve doku sıvılarında bulunur. Hücre içindeki ferritin düz endoplazmik retikulumda sentezlenirken, plazma ferritini endoplazmik retikulumda sentez edilip, golgi cisimciğinde glikolizlenir. Plazma ferritin düzeyi hücre içindeki ferritin düzeyi ile doğru orantılıdır ve vücuttaki depo

demirin dolaylı bir göstergesidir. Plazmada bulunan 1 µg ferritin 8-10 mg depo demire eşdeğerdir (31).

Ferritin serumda da bulunur. Bu nedenle serum ferritin düzeyinin ölçümü depo demiri değerlendirmek için dolayısıyla da demir eksikliğini değerlendirmek için kullanılabilir. Serum ferritin düzeyi erkeklerde 20-250 µg/L, kadınlarda ise 10-120 µg/L' dir (32). Ferritinin akut faz reaktanı olmasından dolayı, akut veya kronik inflamasyonlar sırasında ferritin düzeylerini değerlendirmek zorlaşabilir. Bu nedenle diğer demir parametrelerine bakılabilir (25,33).

Hemosiderin, monosit-makrofaj (kemik iliği, dalak, karaciğer) içindedir. Ferritinden daha fazla demir içermesine rağmen, hemosiderin içindeki demir oldukça yavaş çözülür. Ferritin yıkılması sonucu açığa çıkan demir vücut tarafından tekrar kullanılır veya hemosiderin olarak depo edilir (34-35).

2.3.1.3. Transferrin

Transferrin, metal bağlayıcı transport glikoprotein grubundan demire spesifik bir hücre yüzey reseptörüdür (36). Transferrin, moleküler ağırlığı 80 kDa olan tek polipeptid zincirden oluşur. Transferrin geni 3. kromozom üzerinde bulunur. Transferrine bağlı demirin %80'i kemik iliğinde kullanılır (37). Hücreler demir ihtiyaçlarını transferrine bağımlı veya transferrinden bağımsız yollar ile sağlarlar. Ancak demir ince bağırsakta emildikten sonra hücreye alınmasındaki ana yol transferrine bağımlı yoldur (38).

Serum ferritin konsantrasyonunun aksine, sTfR konsantrasyonu inflamatuvar yanıtın ve inflamasyondan etkilenmez. DEAnin tanısı için duyarlı ve kesin bir ölçüm olduğu önerilir. Ancak; özellikle risk grubunda olan çocuklarda ve doğurma yaşındaki kadınlarda dağılımı temsil etmediğinden ve standarizasyonunda eksiklikler olduğundan demir eksikliğini tanısında kullanımını kısıtlıdır (36).

2.3.1.4. Hepsidin

Hepsidin son zamanlarda demir homeostazisinin anahtar bir düzenleyicisi olarak ortaya çıkan küçük bir peptid hormondur (39). Hepsidin prehormon olarak sentezlenir ve aktif formu 25 amino asit içerir (40).

Hepsidin esas olarak karaciğerde sentezlenir. Ancak bazı çalışmalar makrofajlarda, pankreatik beta hücrelerinde, böbreklerde ve adipositlerde de sentezlendiğini göstermiştir. Karaciğer dışı dokularda sentezlenen hepsidin geni, karaciğerde sentezlenen hepsidin geninin aksine inflamasyona demirden daha hassastır (41).

Hepsidin sentezi bazı fizyolojik ve patolojik yollarla düzenlenir. Hepsidin konsantrasyonu demir seviyelerinin artması gereken özel durumlarda azalır. Hipoksi, anemi, demir eksikliği veya talasemi majör ve intermedia gibi inefektif eritropoez ile karakterize olan durumlara yanıt olarak eritropoezin arttığı durumlarda hepsidin konsantrasyonlarında azalma depo demirin salınımına ve besinle alınan demirin absorpsiyonunun artmasına neden olur. Diğer yandan enfeksiyon, inflamasyon ve obezite hepsidin sentezini arttırır (42-43).

Hepsidin; enterositlerde, makrofajlarda, hepatositlerde ve sinsityotrofoblastlarda sentezlenen demir taşıyıcısı ferroportine bağlanarak ferroportinin internalizasyonunu ve degrasyonunu başlatır. Böylelikle bu dokulardan aşırı demir alımı önlenmiş olur. Yüksek hepsidin konsantrasyonları intestinal demir absorpsiyonunu ve kemik iliğindeki sistemik demir mevcudiyetini azaltır. Azalmış hepsidin konsantrasyonu ise ferroportin aktivitesini arttırır ve plazmadaki demir mevcudiyetini arttırır (44).

2.3.2. Demir eksikliği anemisi ve tanımı

Demir eksikliği vücut demirinin Hb yapımını engellemeyecek düzeyde eksik olması, DEA ise demir eksikliği sonucu Hb miktarının azalması olarak tanımlanabilir (1). DEA başka bir ifadeyle; Hb konsantrasyonunun yaşa ve cinsiyete göre 2 SS nin altında olması veya ferritin konsantrasyonunun 15 ng/mL den düşük olması şeklinde tanımlanabilir (2).

Demir eksikliği anemisi gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerin en büyük sağlık sorunlarından biridir. Çocuklarda mental, motor ve kognitif fonksiyonları etkiler ve tedavi edilmediğinde gelişim basamaklarında ve zeka puanlarında kalıcı düşmeye neden olabilir (3). Çocuklarda demir desteğinin kognitif, motor ve fiziksel gelişmelere katkı sağlayacağına dair kısıtlı çalışmalar mevcuttur. Kadınlarda ise demir desteği fiziksel ve kognitif performansı ve iş verimliliğini arttırır ve hamilelik sırasında maternal, neonatal ve infan gelişimine katkı sağlar (45).

Dünya genelinde bilimsel ve ekonomik gelişmelere rağmen dünya popülasyonunun nerdeyse çeyreği anemidir. WHO'nun tahminlerine göre dünya genelinde hamile kadınların %42 si, 15-50 yaş arası hamile olmayan kadınların %30 u, okul öncesi çocukların %47 ve erkeklerin %12,7 si anemidir (45). Anemi dünya genelinde eşit bir dağılım göstermemektedir. Az gelişmiş bölgelerde anemi 5 kat daha fazla görülür. Bazı bölgelerde çocuklarda anemi prevalansı %50 den fazladır, hatta bazı bölgelerde %100 anemi görülür (Tablo 5) (46).

Tablo 5: İnfant ve genç çocuklarda (5 yaşından küçük) anemi prevalansı (46)

Bölge	Prevalans (%)
Afrika	64.6
Asya	47.7
Avrupa	16.7
Latin Amerika	39.5
Kuzey Amerika	3.4
Okyanusya	28.0

Demir eksikliği anemisi dünya genelinde anemilerin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. WHO verilerine göre 2004 yılında DEA yüzünden 273 bin ölüm gerçekleşti. Bu ölümlerin; %45 i Güneydoğu Asya, %31 i Afrika, %9 u Doğu Akdeniz, %4 ü Batı Pasifik ve %3 ü Avrupa'da meydana gelmiştir (45). Asyalı çocuklarda DEA diğer ırklara göre daha çok görülmektedir (4).

Türkiye'de 2003-2008 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı bir çalışmada 6-24 aylar arasındaki bebeklerde DEA sıklığı %12-46 arasında bulunmuştur (2). 2004 yılında yapılan başka bir çalışmada ise DEA sıklığı 6-12 aylık çocuklarda %7,8 saptanmıştır (3). Elazığ'da 4 ay-18 yaş arası çocuklarda yapılan çalışmada DEA sıklığı %12,7 olarak saptanmıştır (5). Bursa'da sosyoekonomik düzeyi düşük bir bölgede yapılan çalışmada 2-6 yaş arası çocuklarda DEA %7,4 olarak bulunmuştur (6). Erzurum'da yapılan bir çalışmada ise 6 ay-6 yaş arası çocuklarda DEA %6,5 olarak saptanmıştır (7).

2.3.3. Demir eksikliği anemisi nedenleri

Demir eksikliği; yetersiz demir alımı ve absorpsiyonu, büyüme sırasında artan demir ihtiyacı ve aşırı demir kayıpları sonucu oluşabilir. Çocuk doğurma çağındaki kadınlar

menstrüasyondan dolayı potansiyel risk altındadırlar. Hamile ve doğum yapan kadınlar fetal ve plental gereksinimler ve doğurma sırasındaki kanama yüzünden net 580-600 mg demir kaybı yaşarlar (47). Çocuklarda eritrositlerin hızlı genişlemesi sonucu diyetle alınması gereken demir ihtiyacı artar. 6-12 aylık bir bebeğin ortalama demir ihtiyacı (6,9 mg) yetişkin bir erkeğin ortalama demir ihtiyacından (6,0 mg) fazladır (45). Doğum öncesi ve perinatal faktörler demir durumunu etkileyebilir. Maternal demir durumu fetüs de demir birikimin etkileyebilir ve maternal Hb ve alınan demir desteği infant demir depolarını etkileyebilir. Ayrıca maternal demir depoları doğum ağırlığını ve gebelik süresini etkiler. Bu nedenlerden dolayı; hamile ve çocuk doğurma çağındaki kadınlar ve okul öncesi çocuklar DEA için potansiyel risk altındadırlar (48).

Ergenlik döneminde hem erkeklerde hem de kızlarda demir gereksinimi artar. Erkeklerde kas kitlesinin artması nedeniyle, kızlarda ise menstrüel kayıplar nedeniyle demir gereksinimi artar (49).

Kan kaybı, demir eksikliği anemisinin önemli sebeplerinden biridir. Kadınlarda doğum öncesinde, doğum anında ve doğum sonrasındaki kan kayıpları DEA için önemli bir risk faktörüdür. Kanama çocuklarda ve ergenlerde sonradan gizli veya açık şekilde meydana gelebilir. Demir eksikliği bağırsakta gizli kan kaybı ile sonuçlanabilir. Bu nedenle demir eksikliği bulunan çocukların %50 sinden fazlasında gaitada gizli kan testi pozitifdir (19).

Süt çocukluğu dönemindeki çocuklarda inek sütü; hem gastrointestinal kanamaya yol açtığından hem de demir emilimi az olduğundan demir eksikliği anemisine yol açar. Anne sütünde demir emilimi %49 iken inek sütünde bu oran %10 dur. Anne sütünde bulunan laktoferrin demir emilimini arttırdığından anne sütü ile beslenen çocuklarda demir eksikliği nadir görülür (19).

Demir eksikliği anemisi nedenleri Tablo 6'da özetlenmiştir (19).

Tablo 6: Demir eksikliği anemisi nedenleri (19)

1. Diyete bağlı alım azlığı
2. Yetersiz absorpsiyon (malabsorpsiyon sendromları, uzun süreli ishaller, gastrektomi sonrası, inflamatuvar bağırsak hastalıkları)
3. Artmış demir ihtiyacı
 - a. Düşük doğum ağırlıklı bebekler
 - b. Düşük doğum ağırlıklı ikizler veya çoğul doğumlar
 - c. Adölesan evresi
 - d. Gebelik

e. Siyanotik konjenital kalp hastalığı

Tablo 6: Demir eksikliği anemisi nedenleri (Devam) (19)

4. Kan kaybı

A. Prenetal, perinetal devre

1. Transplasental, retroplasental, intraplasental kanamalar
2. Plasenta previa
3. Fetomaternal kanama
4. Umblikal kord ruptürü

B. Postnatal devre

1. Gastrointestinal sistem
 - a. İntestinal hemoraji
 - b. İnek sütü alerjisi
 - c. Anatomik lezyonlar
 - d. İlaçlar
 - e. İntestinal parazitler
 - f. Henoch-Schönlein purpurası
 2. Safra kesesi (hemokolesistit, kolelitiazis)
 3. Akciğer (pulmoner hemosideroz, Goodpasture sendromu)
 4. Burun kanaması
 5. Uterus (menstrual kanama)
 6. Kalp (intrakardiak miksoma, valvüler protez ve yamalar)
 7. Böbrekler (tramvatik hemolitik anemi, hematüri, nefrotik sendrom)
 8. Ekstrakorporeal (hemodializ, travma)
 9. Sık aralıklarla kan vericiliği
-

2.3.4. Demir eksikliği anemisinde klinik bulgular

Demir eksikliği anemisi; hematolojik bir hastalık olmasının yanı sıra birçok fonksiyonu etkileyen sistemik bir bozukluktur. Demir çoğu organın fonksiyonu için gerekli olduğundan eksikliğinde birçok sistem etkilenir (50). Demir eksikliğine özgü klinik bir bulgu mevcut değildir. DEA hastalarında genellikle soluk ten ve iştahsızlık görülür. Anemilerde sekonder bulguların yanı sıra düzenli kontroller ile de DEA ortaya çıkabilir. Demir eksikliğinde, hücre içinde ve dolaşımda bulunan demir içeren bileşimler işlevlerini yeterince yerine getiremez ve buna bağlı olarak hücre fonksiyonlarda, büyümede ve motor gelişimde, davranış ve bilişsel fonksiyonlarda, fizik kapasite ve iş gücünde, immun sistemde, gastrointestinal sistemde, termoregülasyonda, deri ve mukozalarda önemli değişiklikler meydana gelir (3,51).

Aneminin ilerleyişiyle birlikte; bebeklerde iştahsızlık, solukluk, huysuzluk, huzursuzluk büyük çocuklarda ise halsizlik, yorgunluk, baş ağrısı, çarpıntı ve sistolik üfürüm gibi DEA ne özgü olmayan bulgular ortaya çıkar. Aneminin ilerleyişine ve şiddetine göre bu klinik belirti ve bulgular değişebilir. Genelde deri ve mukoza soluktur, tırnak ve saç kolay kırılır, tırnaklarda kaşık tırnak görünümü olur, iştahsızlığa bağlı olarak büyümede gerilik olur (52-53). Ayrıca toprak, buz gibi anormal gıdalara yönelim (pika hastalığı) görülebilir (54).

2.3.5. Demir eksikliği anemisinde laboratuvar bulguları ve tanı

Demir eksikliği anemisinde diagnostik olan bulgular; periferik kan, kemik iliği ve plazma demir düzeyidir. Periferik kan incelendiğinde hipokrom mikrositoz görülür. Eritrosit yapımında Hb yapımıyla aynı oranda bozulma vardır. Htc düşer, serum demirinde düşüş, doymamış demir bağlama kapasitesinde (DDBK) ise artış görülür. Serum ferritin değerleri azalır, eritrosit içi serbest protoporfirin düzeyleri artar. Kemik iliğinde ise eritroid hiperplazi vardır, mikronormoblastlarda artış vardır. İlik demir depoları azalır. Miyeloid ve megakaryositer seriler normaldir (34). Demir eksikliği anemisi tanısı koymak için incelenmesi gereken laboratuvar bulguları Tablo 7'de özetlenmiştir (19).

Tablo 7: Demir eksikliği anemisi tanısı için gerekli testler (19)

1. Hemogloblin: Hb düzeyleri kabul edilebilir değerlerin altındadır (Tablo 1)
2. Eritrosit indisleri: MCV, MCH ve MCHC normal değerlerin altındadır. Düşük MCV ile ilişkili RDW demir eksikliği için en iyi tarama testidir. RDW demir eksikliğinde %14,5 den büyüktür.
3. Periferik yayma: Eritrositler anizositoz ve poikilositoz ile birlikte hipokromik ve mikrositiktir.
4. Retikülosit sayısı: Genelde normaldir. Ancak kanama ile ilişkili şiddetli DEA da %3-4 görülebilir.
5. Plaketalet sayısı: Plaketalet sayısı trombositemiden trombositoze çeşitlilik gösterir. Genelde şiddetli DEA da trombositemi görülürken, bağırsakda kanama ile ilişkili DEA da trombositoz görülür.
6. Serbest eritrosit protoporfirini (SEP): SEP normal değeri 15.5±8.3 mg/dL dir. DEA de SEP 40 mg/dL nin üzerine çıkar.
7. Serum ferritin: Serum ferritin düzeyleri 12 mg/dL nin altına düştüğünde demir eksikliği düşünülür. Ancak ferritin akut faz reaktanı olduğundan DEA ile beraber bakteriyel veya parazitik enfeksiyon, malignansi veya kronik inflamasyon olduğunda serum ferritini normal çıkabilir.
8. Serum demiri: DEA tanısı koymak için serum demiri düzeyi ölçümünün birçok kısıtlaması vardır. Serum demir düzeyi; demir absorpsiyonu, Hb sentezi için demir kullanımı, eritrosit yıkımından açığa çıkan demir ve demir depoları gibi birçok faktör tarafından dengede tutulur. Diurnal varyasyonu nedeniyle serum demiri gün içinde değişebilir. Ayrıca yaş, cinsiyet, ölçüm metodu gibi birçok değişkenden etkilenir. Bu nedenlerden dolayı DEA tanısı için serum demir düzeyi kullanışlı değildir. Ancak DEA da genel olarak serum demir

düzeylerinde düşme görülür.

9. Toplam demir bağlama kapasitesi: DEA de serum demirinde düşüş görülürken TDBK da artış görülür.

MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini
RDW: Eritrosit hücre dağılım genişliği

MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

2.4. Talasemiler

2.4.1. Hemoglobin

Hemoglobin ilk defa 1840 yılında Hünefeld tarafından bulunmuştur (55). Hb gen dizisi belirlenen ilk proteindir (56).

Hemoglobin demir içeren oksijen taşıyıcı bir metaloproteindir. Çoğunlukla RBC de bulunan Hb tüm omurgalılarda bulunur (55). Hbnin temel fonksiyonu akciğerlerden periferik dokulara oksijen taşımak ve periferik dokulardan akciğerlere karbon dioksit taşımaktır (56). Ayrıca Hbnin karbon monoksit ve nitrik oksit (NO) ile ilişkisi bilinir (55).

Hemoglobin 11. ve 16. kromozomlar üzerinde bulunan iki gen tarafından kodlanan iki α globulin zinciri ve iki β globulin zincirinden oluşan bir tetramerdir. Her iki zincir bir hem parçası içerir, ve bu parça sayesinde zincirler oksijen taşıyabiliyor. Fizyolojik şartlar altında solunum organlarından çeşitli dokulara RBC aracılığıyla oksijen taşınır (55).

Hemoglobin akciğerler, nöronlar, retina ve endometriyum dokularının epitel hücrelerinden ifade edilir. Hb ile ilgili son çalışmalar Hbnin; eritroid dışı hücreler, makrofajlar, alveolar epitel hücreleri, akciğerler, retinal pigment epitel hücreleri, mezanjial hücreler, hepatositler, nöronal/gliyal hücreler, endometriyal hücreler ve boyun hücrelerinden ifade edildiğini göstermiştir (55).

İnsanlarda altı tip Hb bulunur; embriyonik, Gower-I, Gower-II, Portland, fetal hemoglobin (HbF) ve yetişkin hemoglobindir (HbA ve HbA₂) (57).

2.4.2. Talasemilere genel yaklaşım

Talasemiler bir veya daha fazla globulin zincirinin sentezinde azalma veya yokluğuyla tanımlanan otozomal resesif geçişli kalıtsal Hb bozukluklarıdır (8). β talasemi, β globulin zincirlerinin sentezinde kısmi veya tam eksiklik sonucu meydana gelen ve en

sık görülen hemolitik anemidir (10,58). İlk kez 1925 yılında Thomas Cooley tarafından derin anemi, belirgin hepatomegali, büyüme geriliği ve kemik deformiteleri olan Yunan ve İtalyan dört çocukta tanımlanmıştır ve “Akdeniz Anemisi” olarak da bilinir (59). WHO, dünyada talasemi ve anormal Hb sıklığını %5,1 olarak belirtmiştir. Dünyada tahminen 270 milyon taşıyıcı vardır ve bunların yaklaşık 80 milyonu β talasemi taşıyıcısıdır (10).

β talasemi taşıyıcılığı sıklığının dünya genelinde %1,5 olduğu düşünülmektedir (11). β talasemi Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Uzak Doğu ve Güney Doğu Asya da yaygındır (8). Türkiye’de en sık görülen talasemi şekli β talasemidir. Yapılan bir çalışmada Türkiye’de β talasemi taşıyıcılığı %2,1 olarak bulunmuştur (12). Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobülinopati Konseyinin son yıllarda Marmara, Ege ve Akdeniz bölgesinde yaptığı tarama sonuçlarına göre 377.339 kişinin taranmasında ortalama talasemi taşıyıcılığı %4,3 bulunmuştur (12).

Talasemiler sentezi bozulmuş olan globulin zincirine göre adlandırılır. Klinikte önemi olan ve en sık görülen talasemiler α ve β talasemilerdir (9).

Her bireyin genomunda, 16 nolu kromozomların her birinde iki tane olmak üzere toplam dört α globulin geni bulunur. α talasemide en sık görülen gen delesyonudur. Dört α geninden biri delesyona uğradığında sessiz talasemi, iki α geni delesyona uğradığında α talasemi taşıyıcılığı veya α talasemi minör, üç α geni delesyona uğradığında Hb H hastalığı, dört α geni delesyona uğradığında Hb Bart hastalığı ortaya çıkar (9).

Her bireyin genomunda, 11 nolu kromozomların her birinde bir tane olmak üzere iki β globulin geni bulunur. β globulin genlerindeki hata sonucu hiç β globulin sentezlenmiyorsa (β^0), sentezde azalma varsa (β^+) gen mutasyonu olarak tanımlanır. Eğer β globulin genlerinin birinde hata varsa β talasemi minör veya β talasemi minör taşıyıcılığı, iki gende hata varsa β talasemi majör hastalığı ortaya çıkar (9).

Beta talasemi majör genellikle hayatın erken yaşlarında hayatta kalmak için düzenli olarak kan transfüzyonu gerektiren hipokrom mikrositer bir anemidir. Tekrarlanan kan transfüzyonları kaçınılmaz şekilde demir aşırı yüklenmesine neden olur ve bu da kalp, karaciğer ve endokrin bezlerinin çoklu organ bozukluğuna yol açar (60).

Beta talasemi majör hastaları kronik transfüzyon tedavisinin yol açtığı şiddetli kardiyak demir yüklemesinden dolayı erken yaşlarda hayatlarını kaybediyor. Bu nedenle bu hastalarda böbrek bozukluklarının gelişeceği kadar zaman olmadığından renal hastalıklar önemli bir problem değildir (60).

2.4.3. β talasemi minör

Beta talasemi minör otozomal resesif bir hastalıktır. β globulin genlerinden birinde β^0 ya da β^+ mutasyonu mevcuttur (61). İlk defa 1925 yılında osmotik lizise artmış direnç gösteren eritrositlere sahip olan hastalarda tanımlanmıştır (59).

Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda β talasemi minör yaklaşık olarak %0,5-10.3 arasında değişmektedir (61).

Beta talasemi minör hastalarında genelde klinik bulgu gözükmez. Ancak enfeksiyon veya hamilelik gibi hematopoitik streslerde anemi gelişmesi yüzünden aşırı durumlarda kan transfüzyonu gerekebilir. Bu hastalarda tam kan sayımında Hb seviyeleri, htc, MCV (<27) ve MCH (<27) düşüktür, RDW ise normaldir. Periferik yaymada mikrositik RBC ile beraber nadiren hipokrom ve poikilositosiz de görülür (9).

Talasemi minör yükselen Hb A₂ (>%3.5) konsantrasyonu ile karakterizedir. Demir eksikliği olan bireylerde kesin tanı koyulmadan önce demir takviyesi yapılmalıdır. Çünkü Hb A₂ konsantrasyonu yanlış olarak düşük çıkabilir. β talasemi minör hastalarının yaklaşık %30-40 ında Hb F (>%1,0) yüksektir. RBC yaşam ömrü azaldığı için β talasemi minörlü diyabetik hastalarda Hb A_{1c} normal diyabetik hastalara göre daha düşük çıkabilir (9).

2.4.4. Mikrositer anemilerde ayırıcı tanı

En yaygın görülen anemi mikrositer anemilerdir. Mikrositer anemilerden en sık görüleni DEA dir. DEA den sonra en sık görülen mikrositer anemi β talasemi minördür. Kronik hastalık anemisinde genelde normositer anemi görülmesine rağmen mikrositer anemi de görülebilir (61).

Klinikte β talasemi minörün DEA den ayrılması gerekir. Genellikle ayırıcı tанда eritrosit göstergelerinden faydalanarak hafif eritrisitoz ve belirgin mikrositoz varlığında β talasemi minör olmasından şüphelenilir (59).

Beta talasemi minörde eritropoez azalmadığından eritrosit sayısı normaldir. Bu durum DEA nin β talasemi minörden ayrılmasını sağlayan Mentzer indeksi ile gösterilir. Mentzer indeksi MCV (fL) nin eritrosit sayısına ($10^6/\mu\text{L}$) bölünmesiyle bulunur. Bu indeks 13 den küçük olduğunda β talasemi minör, 13 den büyük olduğunda DEA olduğu düşünülür. β talasemi minörde periferik yaymada anizositoz görülmez ve bu nedenle RDW normaldir. DEA de ise anizositoz RDW yi yükseltir ve eritropezdaki azalmada RBC sayısını düşürür. Ayrıca β talasemi minör hastalarında Hb A₂ nin yükselmesi DEA den ayrılmasını sağlar (62).

Tablo 8’de yaygın olarak görülen mikrositer anemilerin laboratuvar bulguları karşılaştırılmıştır (61-63).

Tablo 8: Yaygın görülen mikrositer anemilerin karşılaştırılması (61-63)

	DEA	β talasemi minör	Kronik hastalık anemisi
Hb	Azalmış	Azalmış	Azalmış
RBC	Azalmış	Normal/Artmış	Azalmış
MCV	Azalmış	Azalmış	Normal/Azalmış
RDW	Artmış	Normal	Normal/Azalmış
Serum demiri	Azalmış	Normal	Azalmış
Serum ferritini	Azalmış	Normal	Normal/Artmış
Transferrin	Artmış	Normal	Normal
TDBK	Artmış	Normal	Azalmış
Hb A ₂	Normal/Azalmış	Artmış	Normal

2.5. Isı Şok Proteinleri

2.5.1. Moleküler şaperonlar

Yıllar boyunca araştırmacılar protein katlanmaması veya yanlış katlanması sürecini Anfinsen hipoteziyle açıkladılar. Bu hipoteze göre bu süreç için tüm gerekli ve yeterli bilgi proteinin amino asit dizilişinde mevcuttur. Ancak hücrelerin çeşitli stres durumları altında hayatta kalım aktiviteleri incelendiğinde moleküler şaperonlar olarak adlandırılan birçok protein ortaya çıktı. Kelime anlamı refekat eden olan bu proteinler; protein katlanmasını katalizlemesinin yanı sıra, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanma veya agregasyon yolları arasındaki dağılımını düzenler. Ek olarak şaperonlar;

oligomerik komplekslerin düzenlenmesine, zar aracılı taşınmaya ve polipeptid zincirlerinin bozunmasına yardımcı olur (64).

Moleküler şaperonlar ısı şok proteinlerini ve nükleer/histon şaperonları da içeren geniş bir protein ailesidir. Moleküler şaperonlar hücrel sinyalin sürdürülebilmesi için gereklidir (65).

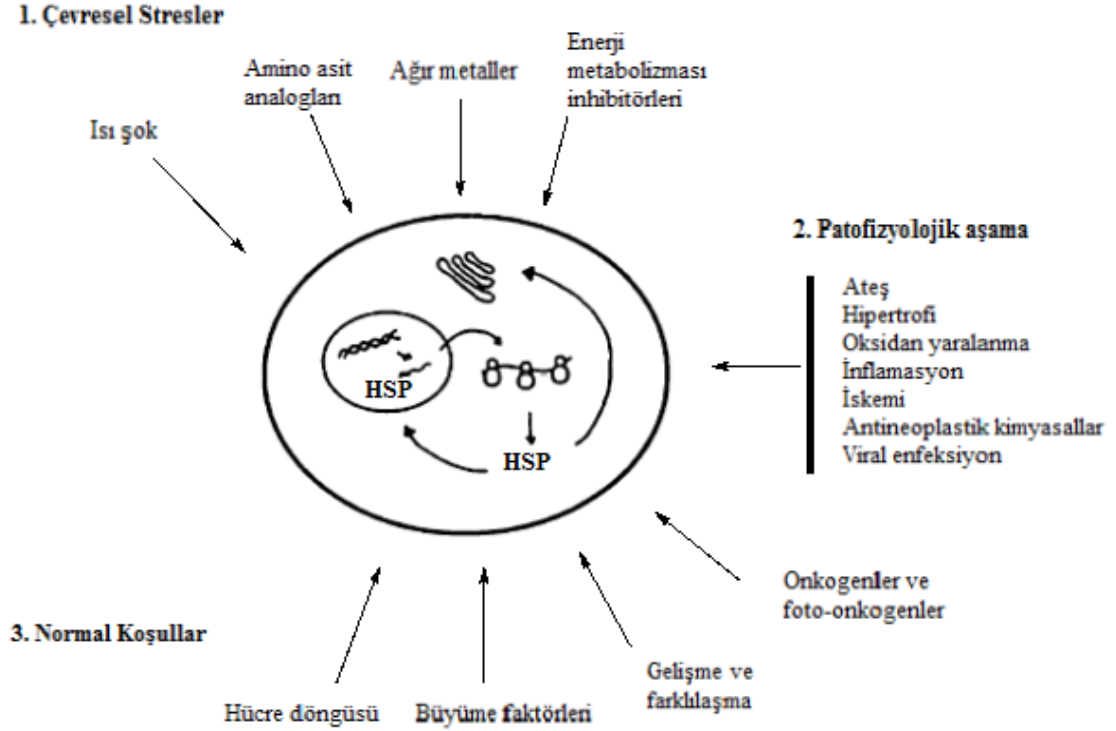
Moleküler şaperonların veya Hsplerin keşfi, kanser, diyabet, kardivasküler hastalıklar ve kronik hepatit gibi hastalıkların tedavisinde yeni bir yol açmıştır (66).

2.5.2. Isı şok proteinleri tanımı ve sınıflandırılması

Memeliler stres koşullarıyla başa çıkabilmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bunlardan önemli biri de stres ile uyarılan Hsplerin sentezi ve fonksiyonlarıdır. Bu proteinler bakteriden insana kadar tüm organizmalarda çeşitli formlarda bulunurlar (67).

Isı şok proteinleri ilk kez 1962 yılında *Drosophila* tükrük bezlerinde ısı yükselmesi sonucu bu hücrelerin jiant kromozomlarında keşfedilmiştir (68). Bu proteinlerin bir ısı şok sonrası hücrelerde biriktiği ve termoresistans özelliklerinin olduğu görüldü. Sonraki çalışmalar bu proteinlerin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde en iyi korunan proteinler olduğunu gösterdi (69).

Isı şok proteinleri aynı zamanda stres proteinleri olarak da bilinirler. Çünkü Hsplerin sentezi; sıcaklık, biyolojik veya kimyasal birçok stres faktörü tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir (14,65). Hspler normal fizyolojik şartlarda düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Ancak Hsplerin konsantrasyonları çeşitli hastalık aşamalarında, oksidatif stresin, toksik stresin ve diğer çevresel değişikliklerin neden olduğu stres sinyalleri sonucunda çok fazla miktarda artar (70). Kemoterapi sonrası tramva, ultraviyole radyasyon, ağır metaller, kanserler, inflamasyonlar, patojen enfeksiyonları, ksneobiyotikler, iskemi, hipoksi, aşırı basınç, serbest oksijen radikalleri, protein kinaz C, kalsiyum arttıran ajanlar, etanol, amino asit ve glikoz analogları, sodyum arsenit, hormonlar, antibiyotikler ve sitokinler Hsp sentezini uyaran bazı stres faktörleridir (15,67,71-72). Isı şok proteinlerini uyaran faktörler Şekil 1'de gösterilmiştir (67).



Şekil 1: Isı şok proteinlerini uyaran faktörler (67)

Isı şok proteinleri için sistematik bir sınıflandırma mevcut değildir. Ancak genel olarak yapılan sınıflandırmalarda memeli Hspleri molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma da araştırmacılar memeli Hsplerini iki (14,16), dört (15), beş (69) veya altı (73-74) gruba ayırmışlardır. Genel olarak Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve düşük molekül ağırlıklı Hspler olarak ayırabiliriz (73). Ökaryotlarda bulunan temel Hspler ve bazı özellikleri Tablo 9’da verilmiştir (73).

2.5.3. Isı şok proteini 60

Isı şok proteini 60, proteinlerin sitoplazmadan mitokondriyal matrise taşınması için esansiyel bir şaperon olan mitokondriyal matris ilişkili bir proteindir (75). Molekül ağırlığı 60 kDa olan Hsp60 (GroEL), şaperonin olarak da bilinir (16,76). Hsp60 hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde bulunur. Hsp60 genel olarak 573 amino asit artığından oluşur (77). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerdeki Hsp60 benzerlik göstermesine rağmen önemli bir yapı farkı vardır. Ökaryotik hücrelerde bulunan Hsp60 fazladan üç sistein artığı içerir. İnsan Hsp60 da bulunan fazla sisteinlerdeki tiyol grupları; potansiyel çapraz bağlanma noktaları, elektrofilik ilaçlar için nükleofilik

bağlanma noktaları ve fonksiyonel organik moleküller ile etiketlenmiş Hsp60 için hedef kısımlar sağlarlar (78).

Tablo 9: Ökaryotlarda bulunan temel Hspler (73)

Sınıf	Şaperon üyeleri	Hücresel kısımlar	Fonksiyonlar
Hsp100	Hsp104	Sitoplazma	Termotolerans etki
Hsp90	Hsp90 Grp94	Sitoplazma Endoplazmik retikulum (ER)	Bazı hormon reseptörlerinin inaktif formlarını hormon salınana kadar stabilize eder, bazı protein kinazların plazma membranını geçmesine yardımcı olur ve denatüre olmuş proteinlerin agregasyonunu önler.
Hsp70	Hsc70 Hsp70 BipGrp78 Grp75	Sitoplazma/nükleoz Sitoplazma/nükleoz ER Mitokondri	Önceden katlanmış veya katlanmamış yapıları translokasyon veya katlanma için stabilize eder, immunoglobulinleri toplar, yaşlanmış proteinleri lizozomlar için hedef yaparak bozunmasını sağlar, protein salınımını ve antijen görüntülenmesini sağlar, termotolerans etki ve bazı immunosupresantlarla etkileşim içindedir.
Hsp60	Hsp60	Mitokondri	Önceden katlanmış yapıları katlanma veya birleşme için stabilize eder, membran boşluğuna öncülleri tekrar aktarır.
Hsp40	Hsp40	Mitokondri sitoplazma/nükleoz	Şaperon aktivite, esansiyel olarak Hsp70 in ATPaz'a oranını arttırmak ve substrat salınımı için ko-şaperon aktivite gösterir.
Düşük molekül ağırlıklı Hspler	Hsp27 α A ve kristalinleri	α B Sitoplazma	Polipeptid agregasyonunu önler, mikrofilamentlerin stabilizasyonu sayesinde termotolerans etki ve hücre büyümesinde görev alırlar.

Ökaryotlarda Hsp60 mitokondri ve kloroplastlar gibi sitoplazmik organellerde yer alır (76). Memeli Hsp60 ailesi mitokondriyal Hsp60 (mt-Hsp60) ve sitozolik Hsp60 (T-kompleks polipeptid-1) olarak iki sınıfa ayrılabilir. Mt-Hsp60 monomerler, heptamerler ve tetradekamerler arasında dinamik bir denge içindedir. Düşük konsantrasyonlarda monomerlerine ayrışırken, ATP ve mitokondriyal ısı şok proteini 10 (Hsp10) varlığında tetradekamer oluştururlar. Sitozolik Hsp60 ise hetero oligomerik halkalardan oluşur ve sitozolde fonksiyon gösterir (79). Sitozolik Hsp60 aktin, tubulin gibi sitoskeletal proteinlerin katlanmasına yardımcı olur (80). Hsp60m büyük bir kısmı mitokondride %15-20 lik bir kısmı ise sitoplazmada bulunur (77). Hsp60 mitokondride önemli bir şaperon görevi görür, mitokondriye yeni alınmış proteinlerin katlanmasında ve düzenlenmesinde ve mitokondriyal protein homeostazisinde hayati görev alır. Sitoplazmik Hsp60 ise belirsiz bir mekanizma ile hücre hayatta kalımını sağlar (81).

Isı şok proteini 60 genellikle fonksiyonlarını bir koşaperon olan Hsp10 (GroES) ile beraber gösterir. Hsp60 her biri 60 kDa olan birbirinin aynı 14 alt üniteden oluşan karmaşık bir oligomerik protein kompleksidir. Hsp60 yedi alt ünite içeren iki adet halkalı yapıyla kombine edilir. Hsp10 ise her biri 10 kDa olan birbirinin aynı yedi alt üniteden oluşur. Hsp10 kubbe benzeri halkalı bir yapıyla kombine edilir (64). Hsp10 mitokondriyal proteinlerin doğru katlanabilmesi için Hsp60'a yardımcı olur (78).

Oksidatif stres Hsp60 sentezini uyarır ve hücreleri hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda korur. Ayrıca oksidatif stres ile uyarılan Hsp60m oksidasyonu azalmış hücresel protein oksidasyonu ile ilişkilidir (81).

Isı şok proteini 60'm hem pro apoptotik hem de pro hayatta kalım özelliği olmasına rağmen genellikle pro hayatta kalım özelliği bilinir. Apoptotik olaylara maruz kalan hücreler incelendiğinde Hsp60m mitokondriden sentezlendiğini ve apoptosiz boyunca proteaz aktivatörler tarafından pro-kaspaz-3 ün olgunlaşmasını hızlandırdığı açığa çıktı. Büyüyen hücrelerde mitokondride bulunan bazı pro-kaspaz-3lerin Hsp60 ve Hsp10 ile kompleks olduğu görüldü. Apoptotik uyarılara aşırı maruz kalındığında mitokondriyal pro-kaspaz-3 ün aktive edildiği ve Hsp60 ve Hsp10 kompleksinden ayrıldığı görüldü. Sitozolda, bu proteinlerin sitoplazmik pro-kaspaz-3'ün ATP bağımlı bir şekilde sitokrom c tarafından aktivasyonunu hızlandırdığı görüldü. Hsp60 m hem mitokondrideki hem de sitoplazmadaki bu rolü Hsp60m pro apoptotik şaperon özelliğini gösterir (75).

Isı şok proteini 60'm pro hayatta kalım özelliği genellikle primer insan tümörlerinde etkilidir. Hsp60 eksikliğinin iyi tolere edildiği normal hücrelerin aksine tümör hücrelerinde apoptosize neden olmamaktadır. Hsp60 m anormal düzeyde ifadesi ilk defa patolojik insan dokusunda kolorektal karsinogenez sırasında görüldü. Kompleks Hsp60 ve Hsp10m aşırı ifadesi karsinogenezin erken belirtilerinden biridir ve bu şaperonların kolorektal karsinogenezde normal hücrelere kıyasla farklı bir rolü vardır. Ayrıca Hsp60m artan ifadesi radikal prostatektomi sonrası tekrar etmeyle ve akciğer adenokarsinomun tanısı ile önemli derecede koreledir. Ancak bronşit, kafa ve beyin kanserlerinde Hsp60 azalan yönde düzenlendiği görüldü. Bu kanser türlerinde Hsp60m pro apoptotik özelliğinin etkili olduğu düşünülür. Böylelikle Hsp60 dikkat çeken tedavi edici bir hedef haline gelmiştir ve Hsp60 seviyesi tanı için bir araç haline gelmiştir (75).

Isı şok proteini 60'm diyabetik farelerin kalbinde düşük seviyede, böbrek ve karaciğerlerinde ise arttığı görülmüştür. Hsp60m diyabetlerde yaralı dokulara karşı farklı hassaslığı bulunduğundan Hsp60 ifadesi değişmektedir. Hsp60m diyabetik hastalarda insülin ile yakın ilişkisi bulunmaktadır. İnsülin eksikliğinin kalpte Hsp60, insülin benzeri büyüme faktörünü ve reseptörünü azalan yönde düzenler (13).

Kardiyovasküler hastalıklarda Hsp60 m aterosklerosis üzerine etkisi incelenmektedir. Hsp60m mitokondride ifade edilip, sitoplazmaya taşınan ve daha sonra hücre yüzeyine taşınan bir stres proteini olmasından dolayı çözünür Hsp60m plazma konsantrasyonunun kardiyovasküler hastalıklarda genetik, biyolojik ve fizyolojik faktörler ile ilişkisi görülmüştür. Ayrıca çözünür Hsp60m yükselen seviyeleri hipertansiyonlu ve kardiyovasküler hastalığın başındaki hastalarla ilişkili bulunmuştur. Hsp60m hücre yüzeyine taşınması apoptosizle ve hastalığın şiddetiyle ilişkili önemli bir stres yanıtıdır. Hsp60 hem doğal bağışıklık sistemini (toll benzeri reseptör 4 ile) hem de adaptif bağışıklık sistemini aktive eder (77).

2.5.4. Isı şok proteini 70

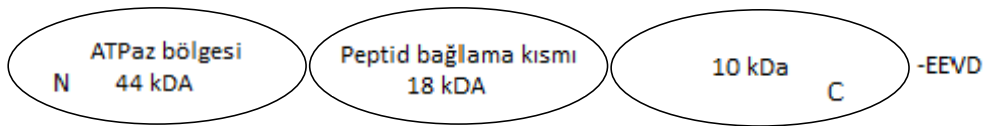
Stres ile uyarılan ısı şok proteini 70 (Hsp70) aynı zamanda HspA1A, Hsp70-1, Hsp72 veya HspA1 olarak da bilinir. Sağlıklı ve stres faktörleri olmayan insanlarda bile az seviyede bulunur (82). Hsp70 ailesi en az sekiz üyeden oluşur. Bunların bazıları organellere spesifik yerleşmiştir, bazıları ise dokulara spesifik ifade edilir (83). Hsp70 ailesinin içerdiği bazı ısı şok proteinleri; temel sitozolik Hsc70 (veya Hsp73), stres ile

uyarılan sitozolik Hsp70 (veya Hsp72), endoplazmik retikulum (ER) Bip (veya Grp78) ve mitokondriyal Hsp70 dir (79). Hsp70 ailesinin tüm üyeleri Tablo 10'da verilmiştir (83).

Tablo 10: Hsp70 ailesi üyeleri (83)

Sistematik ismi	Yaygın kullanılan ismi	Bulunduğu yer	mRNA ifadesi	Stres ile uyarım?
1a	Hsp70A1A	Sitozol/nükleus	Temel	+
1b	Hsp70A1B	Sitozol/nükleus	Temel	+
1t	HspA1L	Sitozol/nükleus	Testisler	
2	-	Sitozol/nükleus	Beyin, testisler	
5	BİP veya Grp78	Endoplazmik Retikulum	Temel	
6	-	Sitozol/nükleus	Kan, immun	+
8	Hsc70	Sitozol/nükleus	Temel	
9	Mortalin veya Grp75	Mitokondri	Temel	

Isı şok proteini 70 ailesinin molekül yapısı üç kısımdan oluşur; 44 kDa, 18 kDa ve 10 kDa. 44 kDa olan kısım N-terminal uçta bulunur ve 1-386 amino asitlik kısmı oluşturur. Aralarında derin bir cep bulunan iki lobdan oluşan dört kısım içerir. 44 kDa olan kısım bir ATPaz bölgesi içerir. 18 kDa olan kısım 384-543 amino asitlik kısmı oluşturur ve katlanmış ve katlanmamış peptidleri bağlamak için peptid bağlama kısmı içerir. 10 kDa olan kısım ise C terminal uçta bulunur ve 542-646 amino asitlik kısmı oluşturur (67). Bu kısım dört amino asitlik EEVD motifi içerir (Şekil 2). C terminal ucu Hsp70 in en az korunaklı kısmıdır. Bu da muhtemelen Hsp70 ailesinin koşaperonlarla etkileşebilmesi içindir (83).



Şekil 2: Hsp70 ailesinin molekül yapısı (67)

Isı şok proteini 70 diğer Hspler ile ortak özellikler ve fonksiyonlar içerdiğinden mekanizması ve özellikleri en çok araştırılmıştır (84). Hsp70 proteinlerin doğru

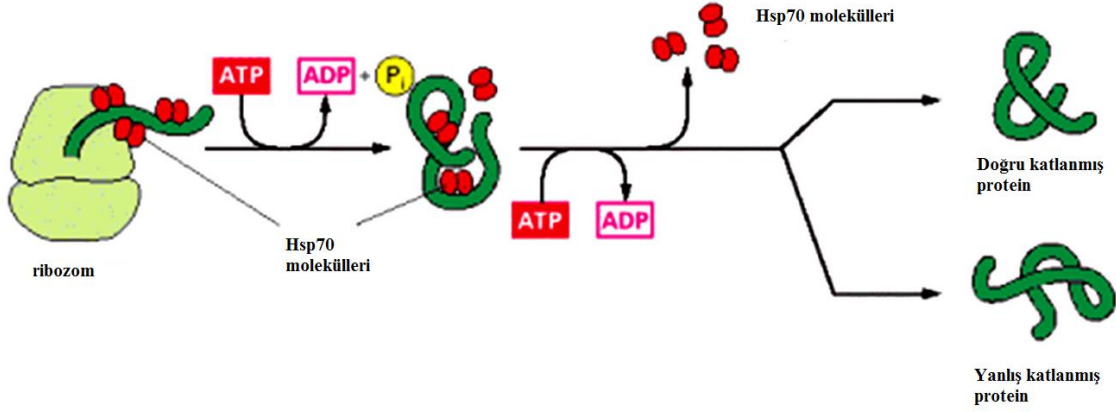
katlanmasına aracılık ederek protein homeostazisini düzenler (83). Moleküler şaperon özelliğın yanı sıra Hsp70 artan sıcaklık, hipoksi, oksidatif stres, değişen pH, iskemi, anti kanser ilaçlar ve ağır metaller gibi stres durumlarında uyarılarak proteinlerin hayatta kalımlarına yardımcı olur (67,83). Hsp70in bu hayatta kalım özelliği stres sırasında hücrede biriken denatüre olmuş ve yanlış katlanmış proteinlerin toksisitesini tamponlamasından ileri gelir. Hsp70in aşırı ifadesi sitokin uyarımının bir sonucu olarak NO üretimini arttırır. NO, Hsp70 ile uyarılarak hücreyi tümör nekrotik faktör- α (TNF- α) ile uyarılan apoptozdan korur (67).

Tüm organizmalarda Hsp70 ailesinden en az biri bulunur. Tüm Hsp70 homologların %50-%99 arasında amino asitleri aynıdır. Hsp70 genelde stres ile uyarılan bir hayatta kalım proteini olarak bilirse de organizmada önemli anahtar rolleri vardır. Bu rollerden bazıları; organeller ve hücreler arasında protein taşınmasını hızlandırmak, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması, protein komplekslerinin ayrılması ve kltrin kaplı veziküllerin soyulmasıdır (83).

Isı şok proteini 70 genel olarak hücredeki yerleşimlerine, doku spesifik ifadelerine ve stres ile uyarılan ifadelerine göre kategorize edilirler (Tablo 10). Grp78 ve Grp75 sırasıyla ER ve mitokondride bulunan organellere spesifik proteinlerdir ve bu dokularda protein katlanmasına ve proteostazinin sürdürülmesine yardımcı olurlar. Diğer altı Hsp70 üyesi ise genelde sitozolde bulunur ancak nükleusda da bulunabilirler. Hsp70-2 tüm hücrelerde düşük seviyelerde ifade edilirken testisler ve beyinde yüksek miktarda ifade edilir. HspA1L de testisler ifade edilir. Hsp70-6 çoğu dokularda bulunmazken kan ve immun hücrelerde çok miktarda ifade edilir ve şiddetli stres sonucu uyarılır. Diğer üç üye ise hücrelerde stres sırasında çok fazla bulunmalarıyla ayırt edilirler. HSC70 temel olarak tüm hücrelerde düşük seviyede ifade edilir ve ısı şok veya diğer stresler ile uyarılmaz. HSC70 şaperon aracılı otofajide rol alır. Hsp70-1a ve b iki amino asit dışında birbirinin aynıdır ve Hsp70-1 olarak isimlendirilirler. Stres sırasında hücrede bulunan proteinlerin yaklaşık %2 sini oluşturur. Hsp70-1 bu ısı şok ailesinin temel stres ile uyarılan hayatta kalım rolünü üstlenir (83).

Isı şok proteini 70 yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinlerin hidrofobik artıklarının uzantılarına acil bir şekilde tanır. Bir takım küçük Hsp40 proteinlerinin yardımıyla Hsp70 monomeri hedef proteine bağlanır ve bir ATP molekülünü ADP ye çevirir. Bu konformasyonel değişiklik Hsp70in hedef proteine sıkı bir şekilde kenetlenmesini

sağlar. Hsp40ın ayrılmasıyla ATP hızlı bir şekilde tekrar bağlanır ve Hsp70 ayrılır. Hsp70'in tekrar tekrar bağlanıp ayrılması hedef proteinin yeniden katlanmasına yardımcı olur (Şekil 3) (67).



Şekil 3: Hsp70 için protein katlanma mekanizması ⁷²

Tümör mikro çevresi; kanser hücrelerini zorlayıcı stres ortamlarına neden olan mutasyona uğramış proteinlerin yanı sıra, serbest radikaller, asidoz, hipoksi ve besin eksikliğine maruz kalır. Bu etkenlerden dolayı Hsp70in yüksek seviyeleri birçok kanser hücresinde görülür. Hsp70 bu hücrelerde; hücre büyümesini artırır, yaşlanmayı baskılar ve stres ile uyarılan apoptoza karşı direnç kazandırır (82).

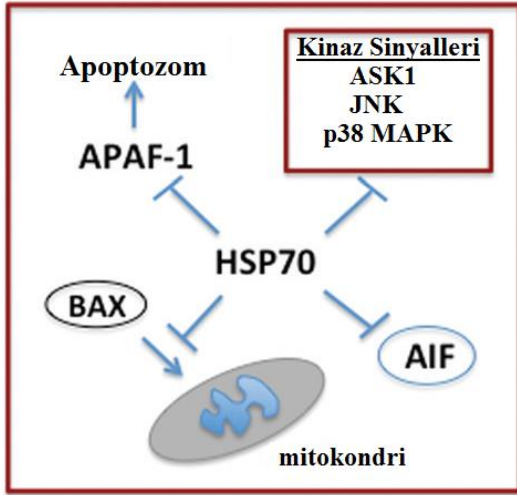
Isı şok proteini 70'in ifadesi birçok kanser için bir tanı ölçütü olabilir. Hsp70in aşırı ekspresyonu artan kanser hücresi çoğalmasıyla, klinik aşamaya veya artan büyüklük ve daha kısa yaşam ömrü ile ilişkilidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar Hsp70in kanser tedavisinde bir belirteç olduğunu göstermektedir. Hsp70; prostat kanseri ve hepatoselüler kanserin erken safhada tanımlanması için iyi bir belirteçdir. Hsp70in yüksek seviyelerde ifadesi; akut miyeloid lösemi ve meme, endometriyum ve rektum kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilidir. Hatta Hsp70 ifadesi özofagus yassı hücre kanserinin ilerlemesini değerlendirmede kullanılabilir. Ancak yükselen Hsp70 seviyeleri kötü prognoz için genel bir belirteç değildir. Örneğin; gastrik kanserinde Hsp70 ile herhangi bir prognostik ilişki yoktur veya renal ve özofagus kanserinde iyi prognoz gösterir. Buna göre Hsp70 ifadesinin klinik sonuçlarla ilişkisi genel olarak kanser tipi ve stres durumlarına bağlıdır. Hsp70in kanser hücrelerine spesifik yüzey yerleşimi veya salınımı bu proteinin ek aktiviteler göstermesinden dolayıdır. Hsp70

kanserde çift role sahiptir; tümör hücrelerinin hayatta kalımını ve yayılmasını arttırmak ve anti tümör bağışıklığa katkı sağlamaktır (82).

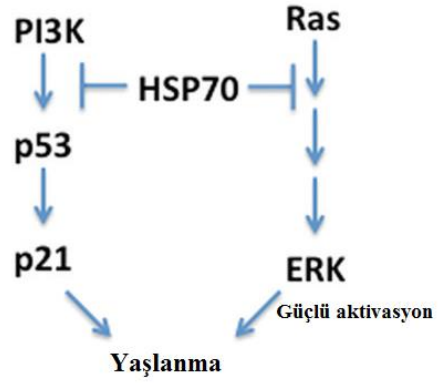
Isı şok proteini 70 kanser hücrelerinde birçok hücre sinyali ve hayatta kalım yoluyla ilişkili olduğundan önem taşır. Kanser ile ilişkili bu yollardan dört tanesi ve Hsp70'in rolü Şekil 4'de gösterilmiştir (83). Hsp70 intrinsek ve ekstrinsek apoptozis yollarını inhibe eder. Hsp70; mitokondride BAX translokasyonunu, APAF-1'in apoptozoma takviyesini, stres ile uyarılan kinaz aktivitesini ve AIF-1 in fonksiyonunu inhibe eder (Şekil 4-A). Hsp70 P53 bağımlı ve bağımsız yaşlanmayı inhibe eder (Şekil 4-B). Hsp70 kanser hücrelerinde spesifik lizozom membranlarına yerleşir, lizozom fonksiyonlarını stabilize eder ve anahtar bir kanser hayatta kalım yoluyla otofajiye izin verir (Şekil 4-C). Hsp70, ısı şok proteini 90 (Hsp90) için zorunlu bir koşaperondur. Hsp90 şaperonunun doğru katlanması ve fonksiyonlarını göstermesi için esansiyeldir (83).

Isı şok proteini 70 apoptozu; stres ile uyarılan sinyalleri inhibe ederek mitokondri öncesi aşamada, mitokondri membran geçirgenliğini önleyerek mitokondri aşamasında ve DNA parçalanması ve kaspaz aktivasyonunu önleyerek mitokondri sonrası aşamada olmak üzere üç aşamada önler (69).

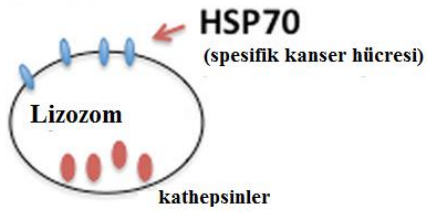
A. Hsp70 apoptozu inhibe eder



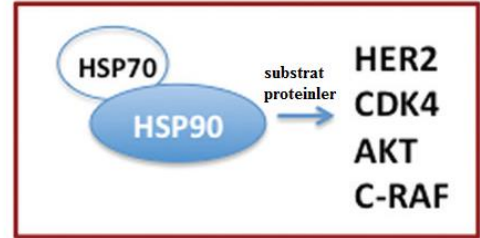
B. Hsp70 onkogen ile uyarılan yaşlanmayı inhibe eder



C. Hsp70 makro otofaji mümkün kılarak lizozom membranları stabilize eder



D. Hsp70, Hsp90 için koşaperon görevi görür



Şekil 4: Hsp70 tarafından etkilenen kanser ilişkili yollar (83)

Isı şok proteini 70 çeşitli intraselüler immün yollarda ve sinyallerde etkilidir. Hsp70 IKK kompleksine, IκB, p65, p50 ve c-Rel'e bağlanarak ve IKK'nin TRAF aktivasyonunu önleyerek Nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyalini azaltır. Hsp70'in NF-κB'ye bağlanması ise NF-κB tarafından düzenlenen TNF-α, IL1, MMP9 ve diğer pro-inflamatuvar araçların seviyesini azaltır. Hsp70 aynı zamanda gliya da uyarılabilen nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonunu ve NADPH oksidaz aktivitesini azaltır ve nötrofillerde süperoksiti artırır. Bu da serbest radikalleri azaltır. Genel olarak Hsp70'in intraselüler etkisi immün yanıtı baskılamaktır (85).

Isı şok proteini 70 ve diğer Hspler stres durumunda hücrelerden serbest çözünür proteinler veya eksozomlar olarak salınır. Hsp70 hücre dışına salındığı zaman doğal ve adaptif bağışıklık sistemini etkiler. Hsp70 monositlerde, makrofajlarda, dendritik hücrelerde ve mikrogliyada TLR-2, TLR-4 ve CD14 yollarını uyarır intraselüler NF-κB,

IRF ve Stat3 sinyallerini aktive eder. Hsp70-peptid kompleksi makrofaj ve dendritik hücrelerde antijen salınımı arttırır. Hsp-tümör peptidleri adaptif bağışıklık sistemi ile tümörlü hücrelerin öldürülmesini hızlandırmak için tümör aşısı olarak geliştirilmektedir. Ekstraselüler Hsp70in pro-inflamatuvar özelliklerinden dolayı bu aşının felç gibi akut hastalıklar ve kronik nörolojik hastalıklarda kullanılması büyük problem oluşturur (85).

İlerlemiş aterosklerotik lezyonlarda Hsp70 monosit, makrofaj, dendritik hücreler ve düz kas hücrelerinde aşırı derecede ifade edilir. Aterosklerotik lezyonların başında ise sadece dendritik hücrelerde ifade edilir (74).

Hayvanlarda hipertermik tedavi kalp ve çoğu diğer dokuda Hsp70 ifadesini uyarılmaktadır. Hsp70 kalpte hipertermi sonrasındaki 24 saatte bol miktarda bulunmaktadır. Hsp70 hipertermi tedavisinden günler sonra bile yüksek seviyede tespit edilebilir. Miyokardiyal koruma genellikle uyarılabilir Hsp70in yüksek derecede ifadesiyle ilişkilidir (86).

Isı şok proteini 70 ailesinin uyarılması nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde faydalıdır. Ancak tedavi seçenekleri genellikle kısıtlıdır. Huntington, Parkinson, Alzheimer ve prionik hastalıklarda sabit veya ilerleyen hücre hasarları protein agregatlarını denatüre eder. Hsp uyarımı bu durumların ilerlemesini önler veya azaltır (66,87).

Ölümcül olmayan sıcaklığa maruziyete karşı önceden hazırlanma, hücreyi ardı sıra gelen daha yüksek ve diğer türlü ölümcül olabilecek sıcaklık veya stresten koruyarak termotoleransı indükler. Hsplerin bu sürece dahil olmaların göstergesi, indüklenebilir sentezleri ve termotolerans gelişmesi arasındaki korelasyondur. Daha sonra Hsp70, Hsp27 ve Hsp110 un, strese karşı hücrel direnç gelişimine katıldığı gösterilmiştir. Termotolerans gelişimi, klinik öneme sahiptir. Hsp70 in aşırı ekspresyonu iskemik stres altındaki protein agregasyonunu engelleyerek miyokardı iskemi ve reperfüzyon hasarından korur. Sıçanlarda serebral iskemide, geçici kısa iskemiye bağlı artmış Hsp110 ve Hsp70 seviyeleri gösteren hippokampal nöronlar, ardı sıra gelen daha ciddi iskemiye karşı tolerans kazanırlar. İskemi esnasında, iyi huylu bir stres proteini olan ubiquitin ekspresyonunda artış izlenmektedir ve ubiquitin sistemi üzerinden protein indirgenmesinin serebral iskemiye takiben nöronal iyileşmenin bir parçası olduğu düşünülmektedir (67,88).

2.5.5. Isı şok proteini 90

Isı şok proteini 90 (Hsp90) moleküler şaperonları birçok proteinin posttransyasyonel olgunlaşmasından, protein agregatlarının çözünmesinden ve denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasından sorumludur. Hsp90 ailesi sitozolik proteinlerin %1-2 sini oluşturan ökaryotik hücrelerde en bol bulunan moleküler şaperonlardır (89). Ökaryotlarda Hsp90; sitozolde, çekirdekte ve organellerde bulunur. Çekirdekte bulunan Hsp90 toplam Hsp90'ın çok azını oluşturur (90). İnsan genomunda Hsp90ı kodlayan 17 gen olmasına rağmen fonksiyonel Hsp90 izoformlarından dördünü üreten sadece altı gen bulunur. Hsp90 α ve Hsp90 β en baskın bulunan iki izoformdur ve esas olarak sitozolde bulunur (89). Her iki form da ısıyla uyarılabilen olmasına rağmen nispeten farklı yollarla düzenlenirler (91). Hsp90 α strese maruz kalındığında uyarılırken, Hsp90 β ise temel olarak aktiftir ve düzen sağlayıcı şaperon olarak bilinir. Hsp75/TRAP-1 mitokondri matriksinde yer alan diğer bir Hsp90 izoformudur. Glukoz düzenleyici protein 94 (Grp94) ise ER da bulunan ve azalan glukoz seviyesine yanıt olarak artan bir Hsp90 izoformudur (89).

Ekstraselüler Hsp90 yapısı bazı ölü hücrelerden az miktarlarda salınır. Bu ekstraselüler Hsp90 hücre hareketliliği ve yara iyileşmesi gibi birçok önemli süreci içerir. Hsp90 α hücre dışında bulunan formdur ve hücreler pasif iken salınmaz. Reaktif oksijen türleri, ısı, hipoksi, radyasyon yayma ve doku yaralanmasıyla salınan sitokinler gibi birçok stres ile salınımı uyarılır. Ekstraselüler Hsp90'ın aktiveşme mekanizması sitozolik Hsp90lardan çok farklıdır. Ekstraselüler Hsp90'ın fonksiyon göstermesi için ATPaz aktivitesine ihtiyaç yoktur. Bunun yerine aktivitesi yük bağlayıcı bölge ile orta bölge arasında yer alan parça ile ilgilidir (92).

Isı şok proteini 90 monomeri dört kısımdan oluşur. Yüksek şekilde korunan N ve C terminal kısmı, orta kısım ve N terminal kısmı ile orta kısım arasında yer alan yük bağlayıcı kısımdır. N terminal kısmı 25 kDa dan oluşan ATPnin bağlanmasından sorumlu olan kısımdır. ATP dışında birçok koşaperon ve bazı Hsp90 inhibitörleri bu bölgeye bağlanabilir. ATP ile yarışmalı bir şekilde bu bölgeye bağlanan bazı bileşikler; geldanamisin ve radisikoldür. C terminal kısmı 12 kDa dan oluşan ve Hsp90'ın biyolojik olarak aktif olan formuna homodimerizasyonundan sorumludur. Orta kısım 40 kDa dan oluşan, N terminala bağlı olan ve yüksek derecede yüklü kısımdır. ATP, N terminale bağlandığında ATPnin γ -fosfatının bağlanmasından sorumludur. Bu bölge

ayrıca substrat proteinlerin ve koşaperonların tanımlanmasından ve bağlanmasından sorumludur (89).

Son zamanlarda Hsp90'ın kovalent modifikasyonu önem kazanmıştır. Hsp90 fosforilasyon, metilasyon, asetilasyon ve nitrosilasyon gibi birçok translayon sonrası modifikasyonla sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu modifikasyonlar Hsp90 şaperon aktivitesini ve böylelikle seçili slient proteinlerin olgunlaşmasını etkiler. Geçici modifikasyonlar ekstra ve intra selüler uyarılara hızlı ve etkili yanıt sağlar (90,92).

Normal hücreler doğal genetik heterojenliklerini arttırmak için Hsp90'u kullanır. Hsp90 normal morfolojik gelişim sırasında meydana gelen mutasyonları engelleyerek gelişim sürecinde çok önemli rol oynar (90).

Ökaryotlarda 20 den fazla koşaperon Hsp90 fonksiyonlarını farklı yollarla düzenler. ATPaz aktivitesinin inhibisyonu veya aktivasyonu, ayrıca spesifik slient proteinlerin iyileştirilmesi bu yollardan bazılarıdır (90).

Ökaryotik Hsp90, Hsp70 ve koşaperon olarak bilinen birçok takı proteinlerinin bir araya gelmesiyle geniş dinamik çoklu şaperon kompleksleri oluşur. Bu kompleksin fonksiyonunu tamamlayabilmesi için, Hsp70/Hsp90 düzeneği yanlış katlanmış proteinlerin bozunması için ubiquitin-prteozom sistemi ile birlikte hareket eder ve böylelikle protein kalite kontrolünde aktif rol oynar (90).

Isı şok proteini 90 yeni oluşan proteinlerin konfarmasyonel olgunlaşmasından ve normal hücresel şartlarda reseptörlerin aktivasyonundan sorumludur. Ayrıca sıcaklık yükselmesi, anormal pH veya besin eksikliği gibi stres durumlarında Hsp90 aşırı miktarda ifade edilir ve Hsp70 ile beraber denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmasına yardımcı olur. Hsp90'ın ve diğer Hsplerin ifadesi transkripsiyon faktör 1 aracılıdır (89).

Isı şok proteini 90 hücre döngüsü, hücre hayatta kalımı, hormon sinyalleri ve hücresel strese yanıt gibi birçok temel hücresel sürece aracılık eder. Böylelikle Hsp90'ın fonksiyonları hücresel homeostazinin devamı için anahtar bir bileşiktir. Ökaryotlarda Hsp90, Hsp90 "slient" denilen 200 den fazla proteinin doğru konfarmasyonunun oluşmasını ve aktivasyonunu sağlar. Bu proteinlerin birçoğu kanserde düzenlenmediğinden Hsp90'ın inhibisyonu kanser tedavisi için tedavi edici bir strateji

oluşturur. Onkogenik mutasyonların engellenmesi ve onkoproteinlerin korunmasıyla Hsp90 tümörogenik hücrelerin stabilizasyonuna yardımcı olur. Hsp90 tümör baskılayıcı protein p53 ile doğrudan etkileşerek ve stabilize ederek kansere karşı hücrel defans oluşturur (90).

Isı şok proteini 90'nın sitotoksik ajanlar tarafından inhibisyonu Hsp90 substrat proteinlerin bozulmasıyla sonuçlanır. Hsp90 ile substratı arasındaki kapalı ve kenetlenmiş konfarmasyonun oluşması önlediği için kompleks ubikitinilasyona ve proteozomal bozunma için hedef haline gelir. Çoklu kaskad sinyalleri aynı anda Hsp90 inhibisyonu ile bozulduğu için, bileşikler kanser tedavisi için mükemmel tedavi edici potansiyele sahip özelliklerini gösterirler. Aksine toksik olmayan moleküllerle Hsp90 uyarımı protein agregatlarının birikmesini minimize eden şaperon seviyelerinin artmasına yol açar. Bu etkilerinden dolayı Hsp90; kanser ve Alzheimer, Parkinson ve multipl skleroz gibi nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde yeni bir yaklaşım oluşturmaktadır (89). Hsp90 Alzheimer hastalığında terapatik hedef olarak iyi bir seçim olabilir. Alzheimer'in baskılanması veya tedavi edilmesi için güçlü bir potansiyel terapatik hedef olabilir (93).

Isı şok proteini 90 kortiosteroid reseptör için şaperon olarak davranabilir. Hsp90'ın yüksek seviyeleri aktif lupus hastalarının periferel kan mono nükleer hücrelerinde tespit edilmiştir. Trombositopeni olan hastalarda Hsp90da önemli bir yükselme görülmüştür (91).

Isı şok proteini 90 Fanconi anemisi yolunun aktivasyonu için gerekli olan Fanconi anemisi proteininin nükleer yerleşmesini ve stabilizasyonunu sağlar (94).

Isı şok proteini 90 plazma membranından apoptotik sinyalin yayılmasında önemli bir faktördür. Hsp90 ölü kinaz kısımlarının ve hücreleri TNF ile uyarılmış ölümlere karşı duyarlı hale getiren reseptör ilişkili proteinlerin aktivitesi için gereklidir. Hsp90'ın bir izoformu olan Hsp75/TRAP-1 TNF reseptörleri ile etkileşir ve TNF sinyalini teşvik eder (95).

Isı şok proteini 90 sitoplazmada birçok kinazın katlanması ve aktivasyonu için gereklidir. Hsp90-Raf1 kompleksinin ayrılması mast hücrelerinde ve B-lenfositlerde apoptozu ile sonuçlanır (95).

Isı şok proteini 90'nın küçük bir kısmı stres durumlarında çekirdekte bulunur ve sıkı bir şekilde histonlarla etkileşim içindedir. Telomer bölgeleri telomeraz enzimiyle sentezlenir ve devam eder. Hsp90 telomeraz ile doğrudan etkileşir ve enzim aktivitesi için gereklidir. Hsp90 prostat kanserinde telomeraz aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Dahası Hsp90 telomeraz aktivitesi için gerekli olan apoptoza karşı görev alan Akt kinazın aktivasyonu için esansiyeldir (95).

Isı şok proteini 90 apoptozda NF- κ B, p53, Akt, Raf-1 ve JNK gibi birçok transkripsiyon faktörleri ve kinazları regüle eder. Hsp90 IKK kompleksi yardımıyla NF- κ B hayatta kalım aktivitesini etkileyebilir (14,16,69). Bu kompleks 2 katalitik ve 1 düzenleyici alt üniteden oluşur, bunlar Hsp90 ve Cdc37 dir. HSP90, p53 ile uyarılan apoptozda da yer alır. Hsp90 mutasyona uğramış p53 ve protein stabilizasyonu ile ilişkilidir. Hsp90 stabilize fosforile Akt ile etkileşir. Fosforile Akt pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi BAD'ı ve kaspaz-9u fosforile eder ve bu da deaktivasyonlarına ve hücre hayatta kalımına yol açar. Akt aynı zamanda I-KB kinazı fosforile eder ve buda NF- κ B aracılı hücre hayatta kalımını teşvik eder (69).

Bir diğer hücre hayatta kalım yolu, Hsp90'ın da dahil olduğu steroid nükleer reseptörler yoludur. Uyarıların varlığında Hsp70; Hsp40 ve Hsp90 ile etkileşime girerek bu yolun aktivitesini korumak için kompleks stabilizasyonuna yol açar. Hsp90 bu reseptörlerin olgunlaşmasında, intraselüler taşınmasında ve regülasyonunda görev alır (69).

Isı şok proteini 90 apoptozu mitokondri sonrası aşamada doğrudan engeller. Hsp90 kaspaz aktivasyonuna yol açan APAF-1 ile ilişkilidir. Bcl-2 ve Hsp90 β kompleksinin oluşumu mitokondriden sitokrom c'nin salınımını ve mast hücrelerinden kaspaz-3'ün aktivasyonunu önler. Bu etki bakteriyel DNA'nın metillenmemiş CpG motifiyle tedavi edilmiş dendritik hücrelerde ve monosit/makrofajlarda görülmüştür. Hsp90 β Bcl-2 ile ilişkili olmasına karşın Hsp90 α ilişkili değildir. Tümör hücrelerinde, Hsp90 mitokondri de molekül RAP-1 ile ilişkili şekilde bulunur. Mitokondriye yerleşmiş olan bu Hsp90 mitokondri zar geçirgenliğini ve sitokrom c salınımını düzenler. Mitokondrial Hsp90'ın inhibisyonu mitokondri membranının depolarizasyonuna ve sitokrom c'nin doz-bağımlı salınımına neden olur. Hsp90 şaperonu normal dokulardan izole edilmiş mitokondride bulunmayıp sadece tümör hücre mitokondrilerinde bulunduğundan bu kanser tedavisinde önemli olabilir (69).

Isı şok proteini 90 potansiyel bir otoantijendir ve arteriyoskleroz gibi bir çok inflamatuvar hastalıklarda görev alır. Hsp90 endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın aktivasyonunda önemli rol oynar. Bu da vazoregülatör NO sentezinin artması ve superoksit anyonu gibi eNOS türevli radikallerin azalmasıyla sonuçlanır. Hsp90 suprabazal keratonisitlerde yüzey epidermisinde temel olarak ifade edilir ve ısı stres ve doku yaralanmasıyla yüzey epidermislerinde uyarılır. Yara hipoksisi sistemik hemodinamiklerin değişmesinin ve yaralanmayla ilgili vasküler bozunmanın bir sonucudur. Yara hipoksisi Hsp90α'nın hipoksiyle uyarılan faktör 1alfa (HIF-1α) aracılı ekstraselüler boşluğa salınmasına bağlı bir mekanizma ile büyüme faktörlerinin varlığında fibroblastların göçünü teşvik eder. HIF-1α aracılı yol, reaktif oksijen türlerine bağlı olan diğer yolların tamamlanması için çoklu büyüme faktörlerinin salınımını kontrol eder (13).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal ve Yöntem

Çalışmamız Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında Helsinki Deklarasyonu Kararlarına uygun olarak Gaziantep Üniversitesi Etik Kurulunun 28.05.2013 tarihli ve 28.05.2013/195 nolu onayı ile başlamıştır. Ayrıca çalışma, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TF.13.28) ve Gaziantep Üniversitesi ÖYP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Çocuk Hematoloji Kliniğine başvurup yaşları 1-16 yıl arasında değişen demir eksikliği anemisi tanısı almış 84 ve β talasemi minör tanısı almış 20 hasta alınmıştır. Kontrol grubu olarak kontrol amaçlı genel çocuk polikliniğine başvuran ve yaşları 1-16 yıl arasında değişen 45 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir.

Gönüllülerden kan alma işlemi Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan alma ünitesinde yapıldı. Hastalardan oturur pozisyonda ön kol antekubital bölgesi %70 alkollü pamuk ile silinerek yapılan sterilizasyondan sonra rutin analizler için kan alındı. Tam kan sayımı için etilendiamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere 2 mL, rutin biyokimya, hormon ve C reaktif protein (CRP) analizleri için antikoagülsüz tüplere 3 mL kan alındı. Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO parametrelerini çalışmak üzere antikoagülsüz tüplere 5 mL kan alındı.

Çalışma için antikoagülsüz tüpe alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Daha sonra kan örnekleri 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilip serum kısmı ayrıldı. Ayrılan serum etiketlenmiş ependorf tüplere alınarak -80 °C' de saklandı.

Demir eksikliği anemisi olan çocuklarda tam kan sayımı yapıp, demir, demir bağlama kapasitesi, toplam demir bağlama kapasitesi, ferritin ve CRP düzeyleri ölçüldü. β talasemi minör olan çocuklarda tam kan sayımı yapıp, demir, demir bağlama kapasitesi, toplam demir bağlama kapasitesi, ferritin ve CRP düzeyleri ölçüldü. Ayrıca Hb elektroforezi yapıldı. Kontrol grubu hastalarında da tam kan sayımı yapıp, demir,

demir bağlama kapasitesi, toplam demir bağlama kapasitesi, ferritin ve CRP düzeyleri ölçüldü. Tüm analizler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapıldı.

Hasta ve kontrol grubunun laboratuvar sonuçları, yaş ve cinsiyet bilgileri hasta dosyalarından alındı.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO düzeyleri ölçüldü.

3.2. Dışlama Kriterleri

1. Beyaz kan hücresi (WBC) $17 \times 10^3 / \mu\text{L}$ den büyük olması
2. Hemolitik anemili hastalar
3. Vitamin B12 veya folat eksikliğinin olması
4. Son 3 ay içinde 1 üniteden fazla kan nakli alan hastalar
5. Hematolojik malignansili hastalar
6. HIV enfeksiyonlu hastalar
7. Tramva geçirmiş olan hastalar
8. Kemoterapi alan veya son 6 ay içinde kemoterapi almış olan hastalar
9. Diyalize giren hastalar
10. Son zamanlarda demir suplementasyonu veya rekombinant eritropoietin veya mikrofölat mofetil tedavisi alan hastalar

3.3. Parametrelerin Ölçülmesi

3.3.1. Rutin analizler

Hastalardan alınan EDTAlı tüplerdeki kan örneklerinde otomatik kan sayım cihazı (Beckman Coulter LH780, ABD) kullanılarak tam kan sayımı yapıldı. Tam kan sayımında; WBC, RBC, Hb, htc, MCV, MCH, MCHC ve RDW parametreleri değerlendirildi. Antikoagülsiz tüplerdeki kan örneklerinde; ferritin düzeyi (Roche

Hitachi Cobas 800, Almanya), demir ve DDBK (Roche Hitachi Cobas E602, Almanya) ve CRP düzeyi (Roche Hitachi Cobas Integre 400, Almanya) ölçüldü.

3.3.2. Isı şok proteini 60

Çalışma için alınıp, ayrılan serum örnekleri derin dondurucudan alınıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Serum örneklerinde Hsp60 (AssayPro, ABD) düzeyi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzim bağlı immunosorbent yöntem) yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu kit insan Hsp60 düzeyini 5 saatte kantitatif sandviç enzim immünoassay tekniğiyle ölçmektedir. İnsan Hsp60a spesifik bir poliklonal antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanıldı. Hsp60 standartları (80,0; 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 ve 2,5 ng/mL) ve örnekler immobilize antikor ve Hsp60 aspesifik biyotinlenmiş poliklonal antikor arasına sıkıştırıldı. Bağlanmayan tüm materyaller yıkılarak uzaklaştırıldı ve peroksidaz enzim substratı eklendi. Renk oluşması için karanlıkta bekletilip, asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ELISA okuyucu (Biotek Instruments ELx800, ABD) ile 450 nm' de okundu. Hasta ve kontrollerin Hsp60 düzeyi standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.3.3. Isı şok proteini 70

Çalışma için alınıp, ayrılan serum örnekleri derin dondurucudan alınıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Serum örneklerinde Hsp70 (AssayPro, ABD) düzeyi ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu kit saflaştırılmış insan Hsp70 antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanır. Hsp70 standartları (300,0; 200,0; 100,0; 50,0; ve 25 ng/mL) ve örnek dilüsyonu ile 5 kat seyreltilmiş örnekler kuyucuklara eklendi. Mikrolaka oda sıcaklığında inkübe edilip bağlanmamış tüm materyaller yıkama yoluyla uzaklaştırıldı. Kuyucuklara HRP konjüгат eklenerek standartlar ve örnekler HRP ile etiketlendi. Mikrolaka oda sıcaklığında inkübe edilip bağlanmamış tüm materyaller yıkama yoluyla uzaklaştırıldı. TMB substratı eklendi. TMB substratı mavi renk oluşmasını sağladı. Reaksiyon sülfirik asit çözeltisi eklenerek durduruldu. Asidin eklenmesiyle renk sarıya döndü. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ELISA okuyucu ile 450 nm' de okundu. Hasta ve kontrollerin Hsp70 düzeyi standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.3.4. Isı şok proteini 90

Hasta ve kontrollerin Hsp90 serum düzeyleri SunRed (Çin) insan ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Bu kit Hsp90 serum düzeylerini ölçmek için ikili antikor sandviç ELISA tekniğini kullanmaktadır. Hsp90 monoklonal antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanıldı. Hsp90 standartları (48,0; 24,0; 12,0; 6,0 ve 3,0 ng/mL) ve örnekler kuyucuklara eklendi. İnkübasyon yapıp, biyotin ile etiketlenmiş Hsp90 antikorları eklendi ve immunkompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP eklendi. Tekrar İnkübasyon yapıp, bağlanmamış materyalleri uzaklaştırmak için yıkama yapıldı. Sonra kromojen A ve B çözeltisi eklendi ve mavi renk oluştu. Asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durdururdu ve son renk sarıya döndü. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ELISA okuyucu ile 450 nm' de okundu. Hasta ve kontrollerin Hsp90 düzeyi standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.3.5. Hepsidin

Hasta ve kontrollerin hepsidin serum düzeyleri SunRed insan ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Bu kit hepsidin serum düzeylerini ölçmek için ikili antikor sandviç ELISA tekniğini kullanmaktadır. Hepsidin monoklonal antikor ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanıldı. Hepsidin standartları (800,0; 400,0; 200,0; 100,0 ve 50,0 ng/mL) ve örnekler kuyucuklara eklendi. İnkübasyon yapıp, biyotin ile etiketlenmiş hepsidin antikorları eklendi ve immunkompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP eklendi. Tekrar inkübasyon yapıp, bağlanmamış materyalleri uzaklaştırmak için yıkama yapıldı. Sonra kromojen A ve B çözeltisi eklendi ve mavi renk oluştu. Asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durdururdu ve son renk sarıya döndü. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ELISA okuyucu ile 450 nm' de okundu. Hasta ve kontrollerin hepsidin düzeyi standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.3.6. Eritropoetin

Hasta ve kontrollerin EPO serum düzeyleri DRG (ABD) insan ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Bu kit EPO serum düzeylerini ölçmek için iki taraflı ELISA yöntemini kullanmaktadır. Streptavidin ile önceden kaplanmış mikrolaka kullanıldı. EPO standartları (158,0; 51,0; 25,1ve 10,1mIU/mL) ve örnekler kuyucuklara eklendi. Kuyucuklara biyotinlenmiş antikor ve enzim etiketli antikor eklenip inkübasyon yapıldı. Mikrolaka bağlanmamış materyalleri uzaklaştırmak için yıkandı. TMB substratı

eklendi. TMB substratı mavi renk oluşmasını sağladı. Reaksiyon asidik çözelti eklenerek durduruldu. Asidin eklenmesiyle renk sarıya döndü. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ELISA okuyucu ile 450 nm' de okundu. Hasta ve kontrollerin EPO düzeyi standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.4. İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 18.0 (SPSS Inc.) istatistik programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm Standart Sapma şeklinde verildi. Hastaların ve kontrol grubunun verileri arasındaki farklar bağımsız gruplarda t testi ile analiz edildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için ANOVA ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrik verilere Pearson korelasyon testi, normal dağılıma uymayan verilere ise Spearman korelasyon testi uygulandı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde 0.05'den küçük p değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi

4. BULGULAR

4.1. Bulgular

Bu çalışmada DEA tanısı alan 84, β talasemi minör tanısı alan 20 hasta ile yaş ve cinsiyet uyumlu 45 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Çalışmaya katılan çocukların 94'ü erkek 55'i kızdı. DEA grubu 57 erkek, 27 kız, β talasemi minör grubu 15 erkek, 5 kız ve kontrol grubu 22 erkek, 23 kızdan oluşuyordu. İstatiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.051$) (Tablo 11).

Çalışmaya katılan tüm çocukların ortalama \pm SS yaşı $7,81\pm 4,60$ yılı. DEA grubunda ortalama \pm SS yaş $7,21\pm 4,82$ yıl, β talasemi minör grubunda ortalama \pm SS yaş $8,45 \pm 4,50$ yıl ve kontrol grubunda ortalama \pm SS yaş $8,62 \pm 4,12$ yılı. İstatiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında yaş açısından anlamlı bir fark yoktu ($p=0,154$) (Tablo 11).

Tablo 11: Çalışma gruplarının demografik verileri

	DEA	β talasemi minör	Kontrol	Toplam	p
Örnek Sayısı (n)	84	20	45	149	
Cinsiyet (K/E, n)	27/57	5/15	23/22	55/94	0,051
Ort. Yaş (Yıl \pm SS)	$7,21\pm 4,82$	$8,45 \pm 4,50$	$8,62 \pm 4,12$	$7,81\pm 4,60$	0,154

Çalışmada yer alan gruplardaki çocukların tam kan sayım verileri Tablo 12'de gösterilmiştir. Çalışmamızda tüm gruplara ait tam kan sayım verileri incelendiğinde; DEA grubunda RBC sayıları β talasemi minör grubundan daha düşük, Hb, htc, MCV, MCH ve MCHC verileri kontrol grubundan daha düşük ve RDW kontrol grubundan daha yüksek bulundu. β talasemi minör grubunda RBC sayıları DEA ve kontrol grubundan daha yüksek, Hb, htc, MCV, MCH ve MCHC verileri kontrol grubundan daha düşük ve RDW kontrol grubundan daha yüksek bulundu (Tablo 12).

Çalışma gruplarına ait tam kan sayım sonuçları (ort ± SS)

Parametre	DEA	β talasemi minör	Kontrol	p
WBC (10 ³ /μL)	8,3 ± 2,6	7,9 ± 2,0	8,1 ± 1,8	>0,05
Nötrofil (10 ³ /μL)	3,67 ± 1,59	3,72 ± 1,38	3,91 ± 1,58	>0,05
Lenfosit (10 ³ /μL)	3,72 ± 1,95	3,29 ± 1,24	3,30 ± 1,39	>0,05
Monosit (10 ³ /μL)	0,65 ± 0,25	0,59 ± 0,18	0,64 ± 0,17	>0,05
Eozonofil (10 ³ /μL)	0,24 ± 0,20	0,25 ± 0,19	0,18 ± 0,15	>0,05
Bazofil (10 ³ /μL)	0,04 ± 0,05	0,05 ± 0,06	0,04 ± 0,09	>0,05
RBC (10 ⁶ /μL)	4,74 ± 0,58	5,53 ± 0,75	4,86 ± 0,61	0,001 ^{a,c}
Hb (g/dL)	10,39 ± 2,06	11,00 ± 1,11	12,91 ± 1,07	0,001 ^{b,c}
Htc (%)	33,08 ± 5,43	34,73 ± 3,10	39,25 ± 3,31	0,001 ^{b,c}
MCV (fL)	69,98 ± 9,54	63,87 ± 9,03	81,54 ± 4,22	0,001 ^{b,c}
MCH (pg)	21,99 ± 3,93	20,34 ± 3,71	26,90 ± 1,71	0,001 ^{b,c}
MCHC (g/dL)	31,21 ± 1,61	31,73 ± 1,68	32,97 ± 0,81	0,001 ^{b,c}
RDW (fL)	18,42 ± 4,35	17,16 ± 3,05	13,76 ± 1,00	0,001 ^{b,c}

a: DEA ile β talasemi minör karşılaştırması

b: DEA ile kontrol karşılaştırılması

c: β talasemi minör ile kontrol karşılaştırılması

Çalışmada yer alan gruplardaki çocukların rutin biyokimya, hormon ve CRP sonuçları Tablo 13'de gösterilmiştir. DEA'de demir ve ferritin hem β talasemi minör hem de kontrol grubundan daha düşük, CRP ise sadece kontrol grubundan daha düşük bulundu. DDBK β talasemi minör ve kontrol grubuna kıyasla DEA'de daha yüksek bulundu (Tablo 13).

Tablo 13: Çalışma gruplarının rutin biyokimya, hormon ve CRP sonuçları (ort ± SS)

Parametre	DEA	β talasemi minör	Kontrol	p
Demir (μg/dL)	43,2 ± 34,1	81,8 ± 30,1	73,4 ± 29,7	0,001 ^{a,b}
DDBK (μg/dL)	382,7 ± 107,4	264,4 ± 62,1	290,7 ± 48,7	0,001 ^{a,b}
Ferritin (ng/mL)	18,6 ± 27,4	50,9 ± 34,8	133,0 ± 143,8	0,001 ^{a,b}
CRP (mg/L)	3,86 ± 2,54	3,41 ± 0,07	4,75 ± 3,83	0,001 ^b

a: DEA ile β talasemi minör grubu karşılaştırması

b: DEA ile kontrol grubu karşılaştırılması

Çalışmada yer alan gruplardaki çocuklar da çalışılan Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO sonuçları Tablo 14’de gösterilmiştir. Hsp60, DEA grubunda β talasemi minör ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulundu. Hsp90, DEA grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. EPO, DEA ve β talasemi minör grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulundu (Tablo 14).

Tablo 14: Çalışma gruplarının Hsp60, Hsp70, Hsp90, EPO ve hepsidin sonuçları (ort \pm SS)

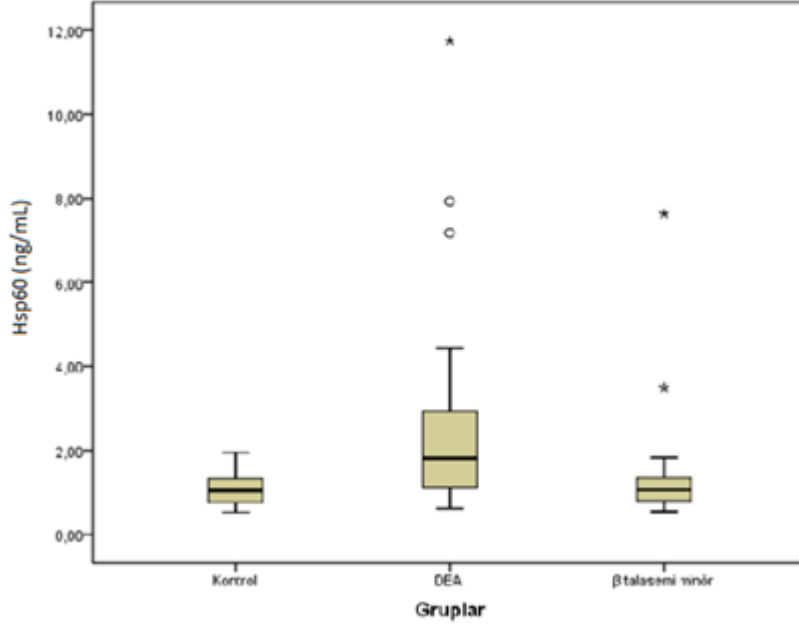
Parametre	DEA	β talasemi minör	Kontrol	p
Hsp60 (ng/mL)	2,34 \pm 1,98	1,57 \pm 1,71	1,08 \pm 0,40	0,001 ^{a,b}
Hsp70 (ng/mL)	90,55 \pm 145,14	63,63 \pm 100,30	36,61 \pm 30,53	0,705
Hsp90 (ng/mL)	52,14 \pm 36,10	41,82 \pm 32,82	28,82 \pm 21,87	0,001 ^b
EPO (mIU/mL)	57,44 \pm 147,46	18,59 \pm 13,70	8,19 \pm 4,38	0,001 ^{b,c}
Hepsidin (ng/mL)	792,94 \pm 704,63	699,59 \pm 677,06	776,97 \pm 702,95	0,778

a: DEA ile β talasemi minör grubu karşılaştırması

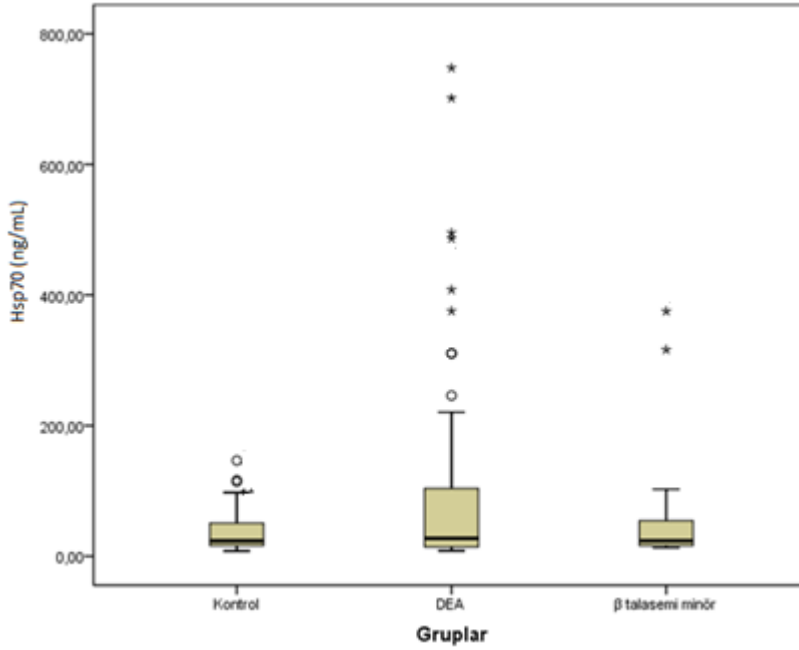
b: DEA ile kontrol grubu karşılaştırılması

c: β talasemi minör ile kontrol grubu karşılaştırılması

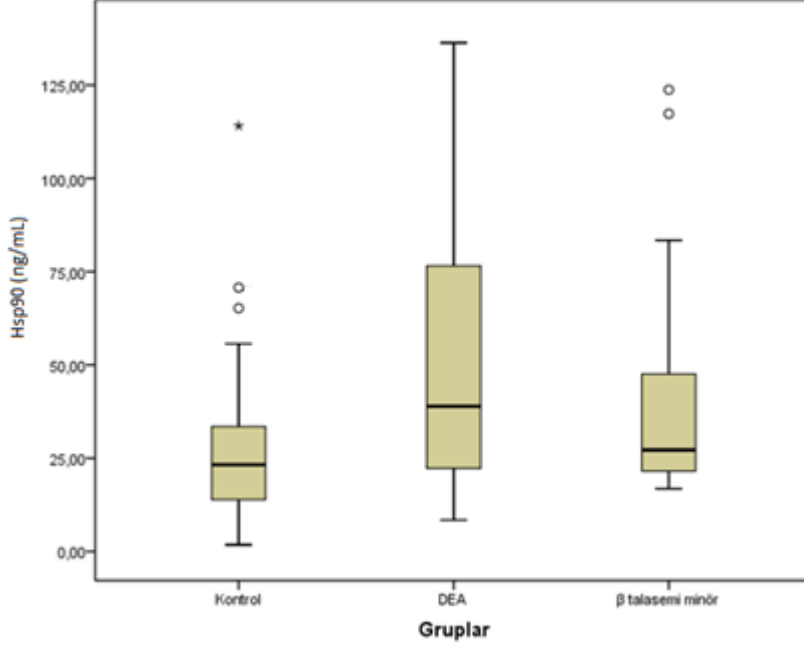
DEA, β talasemi minör ve kontrol grubunun; Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO düzeylerinin ortalama değerleri Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9’da gösterilmiştir.



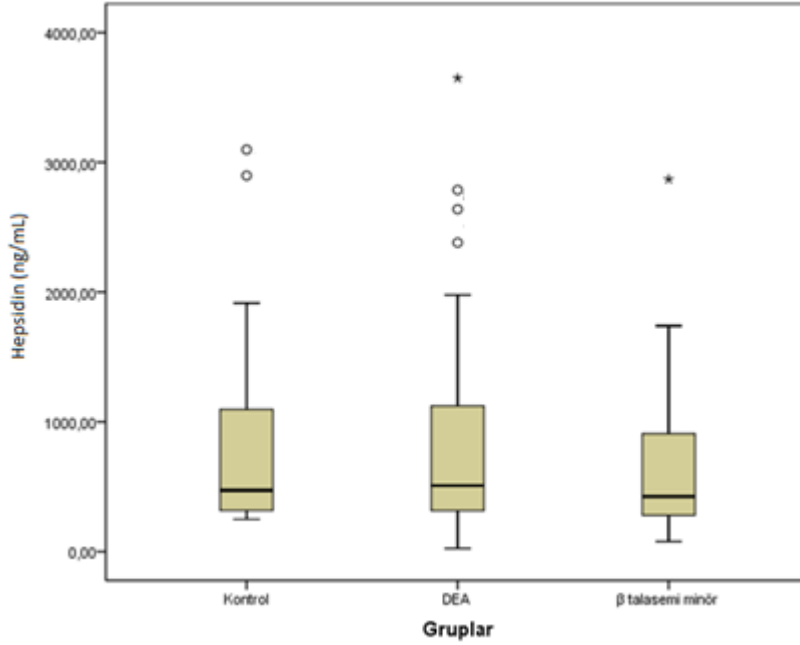
Şekil 5: Hsp60 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı, “o” uç değerleri ve “*” dışlak değerleri göstermektedir.)



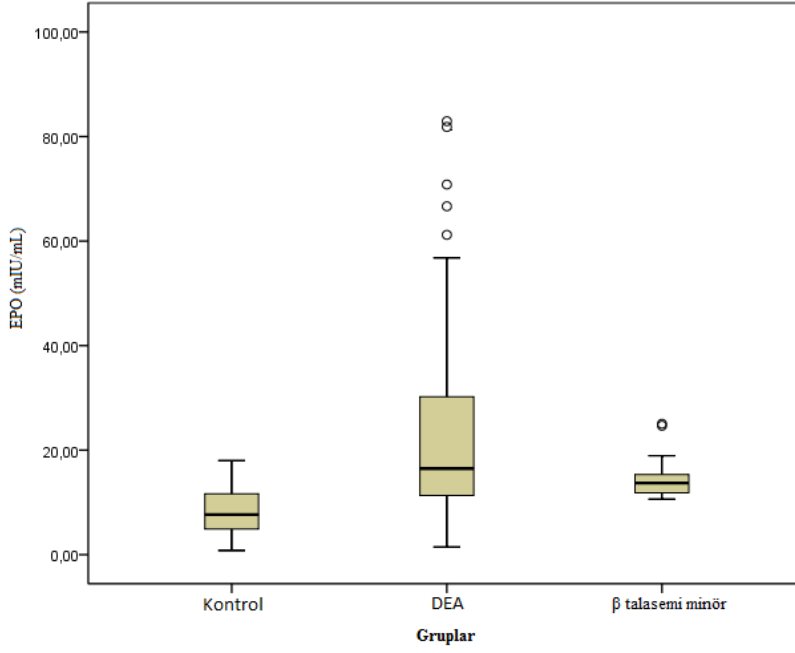
Şekil 6: Hsp70 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı, “o” uç değerleri ve “*” dışlak değerleri göstermektedir.)



Şekil 7: Hsp90 düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı, “o” uç değerleri ve “*” dışlak değerleri göstermektedir.)



Şekil 8: Hepsidin düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı, “o” uç değerleri ve “*” dışlak değerleri göstermektedir.)



Şekil 9: EPO düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı ve “o” uç değerleri göstermektedir. Dışlak değerler grafikte gösterilmemiştir.)

Çalışmaya dahil olan gruplarda; Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun; RBC, Hb, CRP, WBC, demir, ferritin, DDBK ve birbirleriyle korelasyonları incelendi.

Demir eksikliği anemisi grubunda Hsp60 ile DDBK (p:0,024 ve r:0,34) arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır. Hsp70 in Hsp90 (p:0,000 ve r:0,467) ve hepsidin (p:0,000 ve r:0,880) ile arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır. Hsp90 ile hepsidin arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır. EPO nun RBC (p:0,033 ve r:-0,238), Hb (p:0,000 ve r:-0,514), WBC (p:0,009 ve r:-0,290) ve demir (p:0,022 ve r:-0,280) ile arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon, DDBK (p:0,047 ve r:0,245) ile anlamlı düzeyde negatif korelasyon vardır (Tablo 15).

Tablo 15: Demir eksikliği anemisi grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi

	Hsp60	Hsp70	Hsp90	Hepsidin	EPO
Hsp60	1,000	-0,098	-0,083	-0,068	0,049
Hsp70	-0,098	1,000	0,467 ^c	0,880 ^c	-0,045
Hsp90	-0,083	0,467 ^c	1,000	0,525 ^c	0,032
Hepsidin	-0,068	0,880 ^c	0,525 ^c	1,000	-0,116

Tablo 15: Demir eksikliği anemisi grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi (Devam)

	Hsp60	Hsp70	Hsp90	Hepsidin	EPO
EPO	0,049	-0,045	0,032	-0,116	1,000
RBC	0,194	0,102	0,137	0,097	-0,238 ^a
Hb	-0,073	-0,198	0,073	-0,108	-0,514 ^c
CRP	0,111	-0,102	-0,134	-0,132	-0,077
WBC	-0,109	0,041	-0,102	0,053	-0,290 ^b
Demir	-0,278	-0,098	0,024	-0,105	-0,280 ^a
Ferritin	-0,027	-0,121	-0,116	-0,108	-0,160
DDBK	0,340 ^a	0,129	-0,004	0,070	0,245 ^a

a: p<0,05

b: p<0,005

c: p<0,001

β talasemi minör grubunda Hsp70 in Hsp90 (p:0,000 ve r:0,849) ve hepsidin (p:0,000 ve r:0,740) arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır. Hsp90 ile hepsidin (p:0,000 ve r:0,788) arasında da anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır (Tablo 16).

Tablo 16: β talasemi minör grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi

	Hsp60	Hsp70	Hsp90	Hepsidin	EPO
Hsp60	1,000	0,088	0,044	-0,125	-0,135
Hsp70	0,088	1,000	0,849 ^c	0,740 ^c	-0,139
Hsp90	0,044	0,849 ^c	1,000	0,788 ^c	-0,111
Hepsidin	-0,125	0,740 ^c	0,788 ^c	1,000	0,047
EPO	-0,135	-0,139	-0,111	0,047	1,000
RBC	-0,167	0,046	0,203	-0,011	-0,409
Hb	-0,107	0,071	0,043	-0,097	0,200
CRP	0,239	-0,438	-0,339	-0,339	0,340
WBC	-0,034	-0,100	-0,239	-0,224	0,163
Demir	-0,387	-0,383	-0,286	-0,011	0,248
Ferritin	-0,074	-0,169	-0,112	-0,007	0,254
DDBK	0,030	0,210	0,154	0,000	0,102

c: p<0,001

Kontrol grubunda Hsp70 in Hsp90 (p:0,001 ve r:0,473) ve hepsidin (p:0,000 ve r:0,672) ile arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon vardır. EPO ile Hb (p:0,038 ve r:-0,337) arasında anlamlı düzeyde negatif bir korelasyon vardır (Tablo 17).

Tablo 17: Kontrol grubunda Hsp60, Hsp70, Hsp90, hepsidin ve EPO'nun diğer parametreler ve birbirleriyle ilişkisi

	Hsp60	Hsp70	Hsp90	Hepsidin	EPO
Hsp60	1,000	-0,058	0,036	0,375	-0,211
Hsp70	-0,058	1,000	0,473 ^c	0,672 ^c	-0,108
Hsp90	0,036	0,473 ^c	1,000	0,245	-0,223
Hepsidin	0,375	0,672 ^c	0,245	1,000	0,140
EPO	-0,211	-0,108	-0,223	0,140	1,000
RBC	0,147	0,100	-0,129	0,011	-0,261
Hb	0,280	0,006	-0,050	-0,076	-0,337 ^a
CRP	-0,050	-0,101	-0,067	-0,089	0,230
WBC	-0,416	-0,058	0,093	0,066	0,255
Demir	0,117	0,033	0,003	-0,048	-0,032
Ferritin	-0,124	-0,084	-0,256	-0,062	-0,169
DDBK	0,076	0,106	0,001	-0,107	-0,235

a: p<0,05, c: p<0,001

5. TARTIŞMA

Demir eksikliği anemisi, demir eksikliği sonucu Hb konsantrasyonunun yaşa ve cinsiyete göre 2 SS nin altında olması şeklinde tanımlanan gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerin en büyük sağlık sorunlarından biridir (1). Çocuklarda mental, motor ve kognitif fonksiyonları etkiler ve tedavi edilmediğinde gelişim basamaklarında ve zeka puanlarında kalıcı düşmelere neden olabilir (3).

Bilimsel ve ekonomik tüm gelişmelere rağmen dünya nüfusunun nerdeyse çeyreği anemikdir. WHO'nun tahminlerine göre dünya genelinde hamile kadınların %42'si, 15-50 yaş arası hamile olmayan kadınların %30 u, okul öncesi çocukların %47 ve erkeklerin %12,7 si anemikdir. DEA dünya genelinde anemilerin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (45). Türkiye'de 2003-2008 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı bir çalışmada 6-24 aylar arasındaki bebeklerde DEA sıklığı %12-46 arasında bulunmuştur (2). 2004 yılında yapılan başka bir çalışmada ise DEA sıklığı 6-12 aylık çocuklarda %7,8 saptanmıştır (3).

Talasemiler bir veya daha fazla globulin zincirinin sentezinde azalma veya yokluğuyla tanımlanan otozomal resesif geçişli kalıtsal Hb bozukluklarıdır (8). β talasemi minör β globulin genlerinden birinin sentezlenmemesi veya sentezinde azalma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (9). β talasemi taşıyıcılığı sıklığının dünya genelinde %1,5 yaklaşık 80 milyon olduğu düşünülmektedir (10-11). Türkiye'de yapılan bir çalışmada β talasemi taşıyıcılığı %2,1 olarak bulunmuştur. Marmara, Ege ve Akdeniz bölgesinde yapılan tarama sonucunda ise ortalama talasemi taşıyıcılığı %4,3 bulunmuştur (12).

Isı şok proteinleri ısıyla uyarılan proteinler olarak bilinen bir protein sınıfıdır (13). İfadesi birçok çevresel ve fizyolojik strese yanıt olarak uyarılır (14). Hspler en bol bulunan intraselüler proteinlerdendir ve normal fizyolojik şartlarda ifadesi düşüktür (13). Ancak büyüme faktörlerinin bulunmayışı, hipoksi, DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar gibi hücre ölümü sinyalleri Hsp ifadesini çok fazla artırır (14). Artan Hsp ifadesi hücrenin kanser gibi ölümcül koşullarda hayatta kalımını sağlar (15).

Isı şok proteinlerinin birincil görevi moleküler şaperon olmasıdır. Hspler diğer hücrel proteinlerin katlanması sağlar ve proteinlerin kümeleşmesini önler (13). Hsp lerin en önemli fonksiyonlarından biri de güçlü anti apoptotik proteinler olmasıdır. Apoptosis mekanizmasında apoptotik proteinler ile etkileşerek farklı aşamalarda apoptosizi önler (13,16).

Demir eksikliği anemisi dokulara yetersiz oksijen gitmesi nedeniyle doku hipoksisine neden olur (2). Doku hipoksisi EPOnun en önemli uyarandır ve normal koşullarda aneminin klinik derecesine göre eritrosit yapımında artış ile seyretmesi beklenir. Benzer Hb sonuçları ile seyreden DEA ve β talasemi minör arasında belirgin bir RBC sayım farkı mevcuttur, hatta bu fark DEA ile β talasemi minör ayırıcı tanısında kullanılır (96-97). DEAdaki beklenen RBC sayısı artışı olmayışının muhtemel nedenleri arasında azalmış kısa RBC yaşam ömrü ve artmış apoptosiz bulunabilir. Kamei ve ark. yaptıkları bir çalışmada DEA nin besin metabolizmasında önemli değişikliklere neden olduğunu ve bunun apoptoza bile sebep olduğunu söylemişlerdir (18). DEA nin hem doku hipoksisine sebep olması hem de apoptoza yol açması nedeniyle DEA de Hsp etkisi incelenmiştir.

Literatürde Hsplerin birçok hastalık grubunda çalışılmış sonuçları mevcuttur. Bu hastalık grupları vücudun normal fizyolojik şartlarını bozup fizyolojik stres oluşturan hastalıklardır. Atalay ve ark. Hsplerin yara iyileşmesi için esansiyel olduğunu ve diyabetli hastalarda Hspdeki bozuklukların yara iyileşmesini geciktirdiğini ifade etmişlerdir (13). Oglesbee ve ark. diyabetik keto asidozlu hastalarda Hsp70 önemli derecede yükseldiğini ve bu artışın hiperglisemik hiperosmolar dehidratasyon ve metabolik asidozun tedavisini başlattığını ifade etmişlerdir (96). Zhang ve ark. sirkülasyondaki Hsp60 ile koroner kalp yetmezliği riskinin ilişkili olduğunu ve akut miyokard enfarktüsden sonra Hsp60 ın hızlıca yükseldiğini bulmuşlardır (98). Harkins, Hsp ve NOS etkileşim içinde olduğunu ve aşırı egzersiz altında organ yetmezliğini önlediğini ifade etmiştir (99). Wheeler ve ark. ekstraselüler Hsp60 seviyelerinin septik şoklu çocuklarda önemli derecede yükseldiğini bulmuşlardır (100). Marino ve ark. akut hastalıklar sırasında Hsp70 in önemli derecede arttığını bulmuşlardır (101). Li ve ark. Hsp60 durumunun gastrik karsinoma hastalarında invazyonun derinliği ve lenfosit nod metastazıyla ilişkili olduğunu ve Hsp60 seviyeleri daha yüksek olan gastrik karsinoma hastalarının daha kısa hayatta kalma sahip olduğunu bulmuşlardır (102).

Tam kan sayımı, biyokimya ve hormon sonuçları hastalık grupları için beklenen özellikte saptanmıştır. Demir eksikliği anemisi grubunda kontrol grubuna göre; Hb, htc, eritrosit indisleri (MCV, MCH ve MCHC), demir ve ferritinde azalma, RDW ve DDBK da artma vardı. β talasemi minör grubunda kontrol grubuna göre; Hb, htc ve eritrosit indislerinde (MCV, MCH ve MCHC) azalma, RBC de artma vardı. Bu sonuçlar çalışmaya alınan çocukların laboratuvar bulgularının hastalık gruplarını yansıttığını göstermektedir (61-63).

Bu çalışmaya CRP düzeyleri referans aralığın (<5 mg/L) üstünde olan çocuklar dahil edilmedi. Ancak kontrol grubunda CRP, DEA grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu yükseklik normal referans aralığında bir yüksekliktir. Akut bir hastalıktan kaynaklanan bir yükselme değildir. Bu nedenle Hsp sonuçlarını etkilememiştir.

Çalışmamızda örneklerin serum hepsidin düzeyleri ölçüldü. En yüksek ortalama hepsidin düzeyi DEAda en düşük ortalama hepsidin düzeyi ise β talasemi minör grubunda görüldü. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p < 0,05$) (Tablo 12). Hepsidin demir homeostazisi için önemli bir düzenleyici hormondur. Demir gereksiniminin arttığı hipoksi, DEA, talasemi majör gibi durumlarda konsantrasyonu azalır. Bu nedenle DEA de azalmış hepsidin konsantrasyonları beklenir. Hepsidin ifadesi eritropoietik aktivitenin artmasıyla azalır. Çünkü hb yapımı için daha fazla demire gereksinim duyulur bu da hepsidin konsantrasyonunu azaltır. EPO konsantrasyonları incelendiğinde (Tablo 12) DEA ve β talasemi minör grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu veriye göre de hepsidin düzeyinin DEA ve β talasemi minör grubunda daha düşük olması beklenir. Ayrıca hepsidin demir homeostazisi için önemli düzenleyici olmasının yanında bir akut faz reaktanıdır ve enfeksiyon ve inflamasyon durumlarında yükselir. Grupların CRP düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle kontrol grubunda daha yüksek düzeylerde hepsidin konsantrasyonları beklenir. Ancak hepatosit büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörleri, steroid hormonlar gibi birçok hormon hepsidin düzenleyici olarak görev alır ve bu hormonların hepsidin ve demir homeostazisi ve patobiyolojisi üzerindeki rolleri tam olarak bilinmemektedir (40, 41, 44). Çalışmamızda hepsidin konsantrasyonlarının beklenildiği gibi çıkmaması bu hormonlardan ve CRP düzeyleri arasındaki farktan kaynaklanabilir.

Eritropoietin eritroid öncüllerin ve eritroid serinin çoğalmasından ve farklılaşmasından sorumlu olan bir glikoproteindir. Ayrıca EPO eritrositleri apoptoza benzer intihar eylemi olan eriptozdan korur (17,103). EPO uyarımı hipoksi gibi düşük oksijen konsantrasyonunun olduğu durumlarda artar (104). Anemi şiddeti ile EPO arasında ters bir ilişki vardır. Çetin ve ark. Hb konsantrasyonunun azalmasıyla EPO seviyelerinin arttığını göstermiştir (17). DEAdemir eksikliğinden dolayı RBC yaşam ömürleri dolayısıyla RBC konsantrasyonları azalır. Azalmış RBC konsantrasyonları EPO yapımını uyarır. Ancak EPO üretimi serum EPO seviyelerini tam yansıtmaz. Hipoksik koşullar eriptoz artışına yol açtığından azalma görülebilir. Hb düzeylerinden bağımsız EPO düzeylerinin DEA'da Fanconi anemisi, akut lenfoblastik lösemi ve β talasemi intermediadan daha düşük olduğunun göstermesi bunu destekleyici olabilir. Dolayısıyla EPO konsantrasyonu sadece Hb seviyelerine bağlı değil aynı zamanda EPO klirensi, inhibitörler ve EPO tüketiminin bağlıdır (17). Bu çalışmada EPO konsantrasyonu DEA ve β talasemi minör gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. Her iki anemi grubunda hipoksiden dolayı EPO uyarımında artış meydana gelmiştir. Her iki grupta da Hb konsantrasyonlarındaki anlamlı azalma kontrol grubuna göre EPO seviyelerinin artması gerektiğini göstermektedir. DEAdemir eksikliğine göre daha düşük RBC seviyelerine rağmen anlamlı bir fark çıkmaması Çetin ve ark. yaptığı çalışmaya benzemektedir. DEAdemir eksikliğinin daha fazla olmasından dolayı eriptoz artmıştır, dolayısıyla EPO üretimi artarken tüketimide artar ve yaşam ömrü azalır. Bu nedenlerden dolayı EPO düzeyinin DEA ve β talasemi minör arasında farklılık göstermediği düşünülmektedir.

Eritropoietin yükselmesi lökosit oluşumunu inhibe eder. Yani EPO ve WBC arasında ters bir ilişki vardır (105). Tablo 15'e bakıldığında DEA'da EPO ile WBC arasında ters bir ilişki olduğu görülmektedir ($p < 0,005$).

Çeşitli çalışmalarda demir eksikliğinin rhEPO tedavisinin etkinliğinin azalttığı gösterilmiştir (17). Hsp70 ERBP-Epo RNA kompleksi oluşumu ve EPO mRNA stabilitesi için gereklidir (104,106). Diğer taraftan rhEPO sıçan iskemik miyokardiumunda Hsp70 ifadesini artırır (106-107). Benzer şekilde iskemik beyin dokusunda rhEPO, Hsp27 ifadesini arttırmakta ve doku hasarını engellemektedir (108). rhEPO JAK/STAT yolunu aktive eder. Hsp70 ifadesi bu yolun aktivasyonu ile düzenlenir (109). Yani EPO ve Hsp arasında karşılıklı düzenleme mekanizmaları

bulunmaktadır. EPO inflamatuvar yanıtı NF- κ B'yi düzenleyerek etkiler. EPO I- κ B'yi fosforile eder, Bu, NF/ κ B aktivasyonuna ve apoptotik etkili FoxO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ile sitoplazmada tutulmasına ve etkinlik gösterememesine yol açar (110). Hsp de I κ β yıkımını engelleyerek NF- κ β yolağı etkilerini azaltmaktadır (111). Sıçan DNA mikroarray çalışmalarında demir eksikliğinin I- κ B kinaz/ NF- κ β kaskadını etkilediği gösterilmiştir (18). GATA-1 normal eritroid hücre olgunlaşması ve multipotent hemapoietik progenitörlerin eritroid ve megakaryositik serilere dönüşümleri için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca, EPO reseptörü ve globulin genlerinin ifadesinde de rol alır. GATA-1 eritroid hücreler, megakaryositler, mast hücreleri ve eozonofillerde ifade edilir. Nükleusta Hsp70 ile etkileşim GATA-1'i kaspaz 3 aracılı parçalanmadan korur. Hsp70'in nükleer lokalizasyon kusuru GATA-1 ifadesinde kaspaz-3 bağımlı azalmaya yol açmaktadır; Hsp70 GATA-1 transkripsiyon faktörünü parçalanmadan koruyarak eritroid seri hücrelerin yapımını desteklemektedir (112). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar; EPO ile Hspler arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

Hipoksi hem EPO'nun hem de Hsplerin uyarandır. Serum EPO seviyeleri EPO üretimini tam olarak yansıtmada DEA'de azalmış RBC düzeylerinden dolayı EPO üretiminin arttığı bilinmektedir. Nitekim bu çalışmada da EPO düzeyleri DEA'de daha yüksektir. Hsp düzeyleri incelendiğinde Hsp90'm DEA'de kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü. Hsp60'm ise DEA'de hem β talasemi minör grubundan hem de kontrol grubundan yüksek olduğu görüldü. Hspler hipoksi koşullarında uyarılan anti apoptotoik proteinler olduğu bilinmektedir. DEA artmış apoptosiz ile karakterizedir. Dolayısıyla Hsp konsantrasyonlarında artış beklenir. Yapılan çalışmada Hsp60 ve Hsp90'm kontrol grubuna kıyasla daha yüksek çıkması bunu desteklemektedir. Ayrıca Hsp60'm DEA'de β talasemi minör ve kontrol grubundan yüksek olması Hsp60'm DEA ve β talasemi minör arasındaki RBC sayı farkından etkilendiğini veya demirin Hsp60 için bir regülatör olduğunu veya demir eksikliğinin Hsp60 için bir uyarıcı olduğunu gösterir. Hsp90'm ise sadece kontrol grubundan yüksek olması ise Hsp90'm EPO ve Hb konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu gösterir. Bu da EPO ve Hb açısından farksız olan her iki anemi grubunda Hsp90'm farksız olmasının sebebini açıklayabilir.

Demir eksikliği anemisi hem doku hipoksisine hem de apoptoza neden olur. Bu nedenle hipoksiyle uyarılan anti apoptotik bir protein olan Hsp70'in DEA'de artması

bekleniyordu ancak Hsp70 de artış görülmedi. Bu da bize Hsp70'in DEA ile ilişkisi olmayabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. The New England journal of medicine 1999;341(26):1986-95.
2. Kurt AS, Savaser S. Çocuklarda Demir Eksikliği Anemisinin Sıklığı, Nedenleri ve Korunma Yolları:Literatür Taraması. DEUHYO ED 2010;3(4):201-08.
3. Erduran E. Türkiye’de demir eksikliği anemisi ve güncel yaklaşım. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, 2010:75-77.
4. Harris RJ. Iron deficiency anaemia:does it really matter? Paediatrics and Child Health 2007;17(4):143-46.
5. Akarsu S, Kilic M, Yilmaz E, Aydın M, Taskin E, Aygun AD. Frequency of hypoferritinemia, iron deficiency and iron deficiency anemia in outpatients. Acta haematologica 2006;116(1):46-50.
6. Kılıçbay F, Güneş AM, İlçöl YÖ. Bursa ilinde 1-16yaş arası çocuklarda demir eksikliği ve anemisi prevalansı. 2 Uludağ Pediatri Kongresi. Bursa, 2006.
7. Şimşek Ş, Büyükavcı M. Yüksek rakımda yaşayan 6 ay- 6 yaş arası çocuklarda anemi prevalansı ve etiyolojik faktörler. Zeynep Kamil Tıp Bülteni 2007;36(1).
8. Sumera A, Radhakrishnan A, Baba AA, George E. Review: Beta-thalassemia and molecular chaperones. Blood cells, molecules & diseases 2015.
9. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Missouri: Elsevier, 2006.
10. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. Haematologica 2005;90(5):649-60.
11. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bulletin of the World Health Organization 2001;79(8):704-12.
12. Canatan D. Thalassemias and hemoglobinopathies in Turkey. Hemoglobin 2014;38(5):305-7.
13. Atalay M, Oksala N, Lappalainen J, Laaksonen DE, Sen CK, Roy S. Heat shock proteins in diabetes and wound healing. Current protein & peptide science 2009;10(1):85-95.

14. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental cell research* 2012;318(15):1946-58.
15. Jegou G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* 2013;332(2):275-85.
16. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008;12(3):743-61.
17. M. Cetin SU, F. Gumruk, A. Gurgey and C. Altay. Serum erythropoietin levels in pediatric hematologic disorders and impact of recombinant human erythropoietin use. *Turk J Hematol* 2009;26:72-76.
18. Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T, Uehara M, Arai S, Kato H, Nakai Y, Abe K. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiological genomics* 2010;42(2):149-56.
19. Lansky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Amerika Birleşik Devletleri: Elsevier Inc., 2011.
20. Dallman PR, Yip R. Changing characteristics of childhood anemia. *The Journal of pediatrics* 1989;114(1):161-4.
21. Boutry M, Needlman R. Use of diet history in the screening of iron deficiency. *Pediatrics* 1996;98(6 Pt 1):1138-42.
22. Celkan T AH, Ozkan A, Ballı S, Ercan TE, Celik M, Soykan LY, Yıldız I. Demir Eksikliği Anemisinde Önlem ve Tedavi. *Turk Pediatri Arşivi* 2000;35(4).
23. Sherriff A, Emond A, Bell JC, Golding J, Team AS. Should infants be screened for anaemia? A prospective study investigating the relation between haemoglobin at 8, 12, and 18 months and development at 18 months. *Archives of disease in childhood* 2001;84(6):480-5.
24. Ehsani MA, Shahgholi E, Rahiminejad MS, Seighali F, Rashidi A. A new index for discrimination between iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor: results in 284 patients. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 2009;12(5):473-5.
25. Karr MA, Mira M, Alperstein G, Labib S, Webster BH, Lammi AT, Beal P. Iron deficiency in Australian-born children of Arabic background in central Sydney. *The Medical journal of Australia* 2001;174(4):165-8.

26. Donovan A, Andrews NC. The molecular regulation of iron metabolism. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA* 2004;5(5):373-80.
27. Finch CA, Huebers HA. Iron metabolism. *Clinical physiology and biochemistry* 1986;4(1):5-10.
28. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions* 1994;91(2-3):133-40.
29. Uzel C, Conrad ME. Absorption of heme iron. *Seminars in hematology* 1998;35(1):27-34.
30. Massey AC. Microcytic anemia. Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *The Medical clinics of North America* 1992;76(3):549-66.
31. Baynes RD. Refining the assessment of body iron status. *The American journal of clinical nutrition* 1996;64(5):793-4.
32. T. Higgins JHE, J.C. Barton ve B.T. Doumas. In: C.A. Burtis ERAvDEB, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. ABD: Elsevier, 2012:985-1031.
33. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et biophysica acta* 2010;1800(8):760-9.
34. Yılmaz ÖÇ. Samsun ilinde 2-6 yaş arası çocuklarda demir eksikliği anemisi prevalansı [Uzmanlık Tezi]. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2010
35. Moumin N. Demir Eksikliği Anemisi ve Talasemi Taşıyıcılığı Olan Çocuklarda Kalp Hızı Değişkenliği [Uzmanlık Tezi]. Celal Bayar Üniversitesi, 2010.
36. Mei Z, Pfeiffer CM, Looker AC, Flores-Ayala RC, Lacher DA, Mirel LB, Grummer-Strawn LM. Serum soluble transferrin receptor concentrations in US preschool children and non-pregnant women of childbearing age from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2012;413(19-20):1479-84.
37. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood cells, molecules & diseases* 2002;29(3):336-55.
38. Chen H, Zheng C, Zhang Y, Chang YZ, Qian ZM, Shen X. Heat shock protein 27 downregulates the transferrin receptor 1-mediated iron uptake. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006;38(8):1402-16.

39. Campostrini N, Traglia M, Martinelli N, Corbella M, Cocca M, Manna D, Castagna A, Masciullo C, Silvestri L, Olivieri O, Toniolo D, Camaschella C, Girelli D. Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: the Val Borbera study. *Journal of proteomics* 2012;76 Spec No.:28-35.
40. Ruchala P, Nemeth E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends in pharmacological sciences* 2014;35(3):155-61.
41. Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009;91(10):1223-8.
42. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, Wetzels JF, Kiemeneij LA, Sweep FC, den Heijer M, Swinkels DW. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011;117(25):e218-25.
43. Demircioglu F, Gorunmez G, Dagistan E, Goksugur SB, Bekdas M, Tosun M, Kizildag B, Kismet E. Serum hepcidin levels and iron metabolism in obese children with and without fatty liver: case-control study. *European journal of pediatrics* 2014;173(7):947-51.
44. Muller KF, Lorenz L, Poets CF, Westerman M, Franz AR. Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants. *The Journal of pediatrics* 2012;160(6):949-53 e2.
45. Pasricha SR, Drakesmith H, Black J, Hipgrave D, Biggs BA. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood* 2013;121(14):2607-17.
46. Miller JL. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2013;3(7).
47. Bothwell TH. Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *The American journal of clinical nutrition* 2000;72(1 Suppl):257S-64S.
48. Chaparro CM. Setting the stage for child health and development: prevention of iron deficiency in early infancy. *The Journal of nutrition* 2008;138(12):2529-33.
49. Soekarjo DD, de Pee S, Bloem MW, Tjong R, Yip R, Schreurs WH, Muhilal. Socio-economic status and puberty are the main factors determining anaemia in adolescent girls and boys in East Java, Indonesia. *European journal of clinical nutrition* 2001;55(11):932-9.
50. Beard JL, Dawson H, Pinero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutrition reviews* 1996;54(10):295-317.

51. Lozoff B, De Andraca I, Castillo M, Smith JB, Walter T, Pino P. Behavioral and developmental effects of preventing iron-deficiency anemia in healthy full-term infants. *Pediatrics* 2003;112(4):846-54.
52. Provan D. Mechanisms and management of iron deficiency anaemia. *British journal of haematology* 1999;105 Suppl 1:19-26.
53. Akarsu S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y, Aygun AD. Plasma ghrelin levels in various stages of development of iron deficiency anemia. *Journal of pediatric hematology/oncology* 2007;29(6):384-7.
54. Feldman MD. Pica: current perspectives. *Psychosomatics* 1986;27(7):519-23.
55. Saha D, Patgaonkar M, Shroff A, Ayyar K, Bashir T, Reddy KV. Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? *International journal of inflammation* 2014;2014:803237.
56. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2013;3(3):a011858.
57. Irwin JJ, Kirchner JT. Anemia in children. *American family physician* 2001;64(8):1379-86.
58. Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW, Rivella S. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 2007;109(11):5027-35.
59. Karabel D. Talasemi minör ve demir eksikliği anemisi olan çocuklarda serum prohepsidin düzeyleri ve solubl transferrin reseptörü ile ilişkisinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]. Fatih Üniversitesi, 2009.
60. Bakr A, Al-Tonbary Y, Osman G, El-Ashry R. Renal complications of beta-thalassemia major in children. *American journal of blood research* 2014;4(1):1-6.
61. Yılmaz İ. DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ İLE BETA TALASEMİ MİNÖRÜN AYIRICI TANISINDA ERİTROSİT İNDEKSLERİNİN ROLÜ [Uzmanlık Tezi]. Pamukkale Üniversitesi, 2010.
62. Subramaniam G, Girish M. Iron Deficiency Anemia in Children. *Indian journal of pediatrics* 2015.

63. Kliegman RM, Stanton BF, Geme JW, Schor NF, Behrman RE. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Nineteen edition ed. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011.
64. Ryabova NA, Marchenkov VV, Marchenkova SY, Kotova NV, Semisotnov GV. Molecular chaperone GroEL/ES: unfolding and refolding processes. *Biochemistry Biokhimiia* 2013;78(13):1405-14.
65. Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL. Chaperoning stem cells: a role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2009;31(4):370-7.
66. Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-Lopez ME. Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2011;65(4):239-43.
67. Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR. Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1066:222-42.
68. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovascular research* 2001;51(4):637-46.
69. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of innate immunity* 2010;2(3):238-47.
70. Njemini R, Smits J, Demanet C, Sosso M, Mets T. Circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in elderly members of a rural population from Cameroon: association with infection and nutrition. *Archives of gerontology and geriatrics* 2011;53(3):359-63.
71. Tukaj S, Kleszczynski K, Vafia K, Groth S, Meyersburg D, Trzonkowski P, Ludwig RJ, Zillikens D, Schmidt E, Fischer TW, Kasperkiewicz M. Aberrant expression and secretion of heat shock protein 90 in patients with bullous pemphigoid. *PloS one* 2013;8(7):e70496.
72. Bashir S, Bashir H, Qadri SS. Heat shock and the heat shock proteins: An overview. *International Journal of Medical Science and Public Health* 2013;2(3):489-94.
73. Shiber A, Ravid T. Chaperoning proteins for destruction: diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. *Biomolecules* 2014;4(3):704-24.

74. Mehta TA, Greenman J, Ettelaie C, Venkatasubramaniam A, Chetter IC, McCollum PT. Heat shock proteins in vascular disease--a review. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2005;29(4):395-402.
75. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Archives of toxicology* 2013;87(1):19-48.
76. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* 1990;265(21):12111-4.
77. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, Wick MC, Wick G. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011;31(5):960-8.
78. Pace A, Barone G, Lauria A, Martorana A, Piccionello AP, Pierro P, Terenzi A, Almerico AM, Buscemi S, Campanella C, Angileri F, Carini F, Zummo G, de Macario EC, Cappello F, Macario AJ. Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Current pharmaceutical design* 2013;19(15):2757-64.
79. Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cellular & molecular immunology* 2004;1(4):274-9.
80. Kaul G, Thippeswamy H. Role of heat shock proteins in diseases and their therapeutic potential. *Indian journal of microbiology* 2011;51(2):124-31.
81. Sarangi U, Singh MK, Abhijnya KV, Reddy LP, Prasad BS, Pitke VV, Paithankar K, Sreedhar AS. Hsp60 chaperonin acts as barrier to pharmacologically induced oxidative stress mediated apoptosis in tumor cells with differential stress response. *Drug target insights* 2013;7:35-51.
82. Juhasz K, Lipp AM, Nimmervoll B, Sonnleitner A, Hesse J, Haselgruebler T, Balogi Z. The complex function of hsp70 in metastatic cancer. *Cancers* 2013;6(1):42-66.
83. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013;34(6):1181-8.
84. Chen T, Cao X. Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity. *European journal of immunology* 2010;40(6):1541-4.

85. Sharp FR, Zhan X, Liu DZ. Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential. *Translational stroke research* 2013;4(6):685-92.
86. Jones Q, Voegeli TS, Li G, Chen Y, Currie RW. Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms. *Inflammation & allergy drug targets* 2011;10(4):247-59.
87. Lu RC, Tan MS, Wang H, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *BioMed research international* 2014;2014:435203.
88. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology* 1998;16(9):833-8.
89. Peterson LB, Blagg BS. To fold or not to fold: modulation and consequences of Hsp90 inhibition. *Future medicinal chemistry* 2009;1(2):267-83.
90. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1823(3):624-35.
91. Stephanou A, Latchman DS, Isenberg DA. The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1998;28(3):155-62.
92. Jackson SE. Hsp90: structure and function. *Topics in current chemistry* 2013;328:155-240.
93. Ou JR, Tan MS, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 90 in Alzheimer's disease. *BioMed research international* 2014;2014:796869.
94. Yamashita T, Oda T, Sekimoto T. Hsp90 and the Fanconi anemia pathway: a molecular link between protein quality control and the DNA damage response. *Cell cycle* 2007;6(18):2232-5.
95. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics* 2004;101(3):227-57.
96. Oglesbee MJ, Herdman AV, Passmore GG, Hoffman WH. Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. *Clin Biochem* 2005;38(10):900-4.
97. Sirdah M, Tarazi I, Al Najjar E, Al Haddad R. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of the beta-

- thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. *Int J Lab Hematol* 2008;30(4):324-30.
98. Zhang X, He M, Cheng L, Chen Y, Zhou L, Zeng H, Pockley AG, Hu FB, Wu T. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in Chinese. *Circulation* 2008;118(25):2687-93.
99. Harkins MS. Exercise regulates heat shock proteins and nitric oxide. *Exerc Sport Sci Rev* 2009;37(2):73-7.
100. Wheeler DS, Lahni P, Odoms K, Jacobs BR, Carcillo JA, Doughty LA, Wong HR. Extracellular heat shock protein 60 (Hsp60) levels in children with septic shock. *Inflamm Res* 2007;56(5):216-9.
101. Marino LV, Pathan N, Meyer R, Wright V, Habibi P. Glutamine depletion and heat shock protein 70 (HSP70) in children with meningococcal disease. *Clin Nutr* 2014;33(5):915-21.
102. Li XS, Xu Q, Fu XY, Luo WS. Heat shock protein 60 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer. *PloS one* 2014;9(9):e107507.
103. Kim A, Nemeth E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2015;22(3):199-205.
104. Scandurro AB, Rondon IJ, Wilson RB, Tenenbaum SA, Garry RF, Beckman BS. Interaction of erythropoietin RNA binding protein with erythropoietin RNA requires an association with heat shock protein 70. *Kidney international* 1997;51(2):579-84.
105. Schramm R, Kirsch S, Schafers HJ, Langer F, Scheuer C, Nickels R, Harder Y, Menger MD. Erythropoietin inhibits post-ischemic leukocyte adhesion but does not affect rejection in murine cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(10):1185-92.
106. Xu B, Dong GH, Liu H, Wang YQ, Wu HW, Jing H. Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates myocardial infarct size: a possible mechanism involves heat shock Protein 70 and attenuation of nuclear factor-kappaB. *Annals of clinical and laboratory science* 2005;35(2):161-8.
107. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003;17(12):1754-5.
108. Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Journal of cerebral*

blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 2004;24(2):259-70.

109. Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001;21(3):321-6.
110. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The "O" class: crafting clinical care with FoxO transcription factors. *Advances in experimental medicine and biology* 2009;665:242-60.
111. Shanley TP, Ryan MA, Eaves-Pyles T, Wong HR. Heat shock inhibits phosphorylation of I-kappaBalpha. *Shock* 2000;14(4):447-50.
112. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugene C, Sternberg A, Arlet JB, Floquet C, Gyan E, Kosmider O, Dreyfus F, Gabet AS, Courtois G, Vyas P, Ribeil JA, Zermati Y, Lacombe C, Mayeux P, Solary E, Garrido C, Hermine O, Fontenay M. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;119(6):1532-42.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Siirt'in Merkez ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da çeşitli okullarda bitirdi. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne başladı. 2011 yılında aynı bölümden mezun oldu. Aynı üniversitede 1 yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi aldı. 2012 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak başladı. Aynı bölümde 2012 yılında yüksek lisans eğitimine başlamış olup halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.