

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,
HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ BİLİM DALI

**DEMİR EKSİKLİĞİ VE DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ OLAN ÇOCUKLARDA
SİTOKROM C OKSİDAZ, KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN VE
BAKIR SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yan Dal Uzmanlık Tezi

Uzm. Dr. Ayşenur BAHADIR

Trabzon – 2014

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI,
HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ BİLİM DALI

**DEMİR EKSİKLİĞİ VE DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ OLAN ÇOCUKLARDA
SİTOKROM C OKSİDAZ, KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN VE
BAKIR SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yan Dal Uzmanlık Tezi

Uzm. Dr. Ayşenur BAHADIR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol ERDURAN

Trabzon – 2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Demir Metabolizması	3
2.1.1. Organik Hem Demir Emilimi	3
2.1.2. İnorganik (Hem Dışı) Demir Emilimi	4
2.1.3. Hücresel Demir Alınımı	5
2.1.4. Organizmada Demir Dengesi	5
2.1.5. Demirin Fonksiyonları	8
2.2. Demir Eksikliği Anemisi	8
2.2.1. Demir Eksikliği Nedenleri	8
2.2.2. Demir Eksikliğinde Klinik Bulgular	11
2.2.3. Demir Eksikliğinin Dokulardaki Etkisi	11
2.2.4. Demir Eksikliği Anemisi Dönemleri ve Tanısı	13
2.2.5. Demir Eksikliği Anemisi Tedavisi	14
2.3. Bakır Metabolizması	14
2.3.1. Bakır Emilimi	14
2.3.2. Bakırın Fonksiyonları	16
2.4. Demir ve Bakırın Serbest Radikaller Üzerine Etkisi	18
2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri	18
2.4.2. Demir ve Bakır Bağımlı Antioksidanlar	19
2.5. Demir ve Bakırın Mitokondride Enerji Metabolizmasındaki Rolü	20
2.5.1. Mitokondri Fonksiyonları	20
2.5.2. Elektron Taşıyıcıları	21
3. MATERYAL VE METOD	23
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. TÜRKÇE ÖZET	46
8. İNGİLİZCE ÖZET	47
9. KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
COX	: Sitokrom c oksidaz
Ctr1	: Bakır transporter 1
DE	: Demir Eksikliği
DEA	: Demir eksikliği anemisi
DBK	: Demir bağlama kapasitesi
DMT1	: Divalan metal transporter 1
Dcytb	: Duodenal sitokrom b
IRP1	: Demir düzenleyici protein 1
IRP2	: Demir düzenleyici protein 1
IRE	: Demir düzenleyici elementler
Fe⁺³	: Ferrik demir
Fe⁺²	: Ferröz demir
TS	: Transferin saturasyonu
TfR1	: Transferin reseptörü 1
TfR2	: Transferin reseptörü 2

1. GİRİŞ

Demir eksikliği tüm dünyada yaygın görülen bir sağlık problemidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 5-14 yaş arası çocuklarda demir eksikliği anemisinin (DEA) görülme sıklığı tahmini olarak % 46 olarak rapor edilmiştir (1). Demir eksikliği anemisi yetişkinde genelde kan kayıplarına bağlı gelişmekte iken, çocuklarda ise diyetle yetersiz alıma bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Demir yerkabuğunda çok sık bulunan bir metal olmasına karşın genellikle çözünmez tuzlar halindedir ve emilimi çok güçtür. Hayvan dokularındaki hem yapısındaki demir en iyi emilen şeklidir. Ancak dünyada gelişmekte olan ülkelerdeki et yenme oranlarının düşük oluşu ve bitkilerdeki demir içeriğinin yeterli olmaması nedeni ile DEA'si dünyada en sık görülen kansızlık türüdür.

Demir ve bakır esansiyel elementlerdir ve eksikliklerinde hücre fonksiyonları etkilenmektedir. Demir ve bakır elektron değişim reaksiyonunda yani enerji metabolizmasında önemlidir. Demir; dokulara oksijen transportu, elektron transferi, DNA sentezi ve pek çok yaşamsal önemi olan enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Bakır; inflamasyon, infeksiyon ve kanserde önemli rol oynar. Demir ve bakır eksikliği hipokrom mikrositer anemiye neden olmaktadır (1,2).

Organizmada bulunan demirin %60-70'i hemoglobinde ve dolaşan eritrositlerde, %10'u miyoglobinde, sitokromlarda ve demir içeren enzimlerde. Kalan %20-30'u ihtiyaç halinde kullanılmak üzere başlıca karaciğer ve retikuloendotelial sistem (RES) makrofajlarında depolanır. Organizma demiri yararları nedeniyle sıkı bir şekilde korumaya programlanmıştır. Organizmada demir ihtiyacı olduğunda, barsaklardan demir emilir ve enterositin bazolateral tarafına taşınır, oradan da ferroportin aracılığı ile plazmaya demir geçişi sağlanır. Plazmada demirin transferrine yüklenebilmesi için seruloplazmin homologu ve bir transmembran proteini olan hefaestin ile ferröz (Fe^{+2}) demir, ferrik (Fe^{+3}) demir haline okside edilmelidir. Hefaestin demirin yükseltgenmesini sağlayan ve yapısında bakır içeren bir proteindir. Dolayısı ile bakır eksikliği olduğunda demirin

emilimi etkilenmektedir. Hayvan deneylerinde bakır eksikliği olduğunda diyetle alınan demirin emiliminin yeterli olmadığı izlenmiştir. Ayrıca bakır eksikliği olan hayvanlarda barsakta belirgin demir biriktiği saptanmıştır (2,3).

Demir eksikliği anemisinde yapılan çalışmaların çoğunda direkt demir bağımlı ve önemli antioksidan enzimlerden olan katalaz (CAT) enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. CAT enzim aktivitesinin azalması sonucunda serbest radikallerin artışı buna bağlı olarak da hücre ve doku hasarı gelişmektedir (4-6). Demir eksikliği anemisinin iskelet ve kalp kası, karaciğer ve kan hücrelerinde mitokondrial fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda mitokondride sitokrom konsantrasyonlarının azaldığı buna bağlı olarak da solunum zincirinde bozulma tespit edilmiştir (7-10). Sitokrom c oksidaz (COX) enzimi mitokondride bulunan büyük bir transmembran protein olup bakır bağımlı bir enzimdir. Mitokondride elektron taşıma zincirinin son elektron alıcısıdır. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için demir molekülüne de ihtiyaç vardır (2).

Sonuç olarak DEA basit bir anemi değildir. Nörogelişimsel sürecin hızlı olduğu ilk yıllarda DE'nin olumsuz etkilerinden çocuğu korumak için DE'nin tanı ve tedavisi çok ciddiye alınmalıdır. Çalışmamızın amacı, DE ve DEA'li çocuklarda mitokondride demir bağımlı CAT ve bakır bağımlı olup etkisini demir varlığında gösteren COX enzim aktivitelerini ölçerek mitokondrial CAT ve COX enzim aktivitelerinin etkilenip etkilenmediğini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Demir ve bakır insanlar için esansiyel elementlerdir. Demir elektron alıp verme özelliğinden dolayı oksijen taşınması, enerji metabolizması, DNA, RNA ve protein sentezinde yer alır, birçok enzimin yapısında bulunur ya da fonksiyonu için gereklidir. Vücutta ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) olmak üzere iki formda bulunur. Demirin elektron değişimi mitokondrideki redoks aktivitesi için gereklidir. Diğer taraftan demir fazlalığı durumunda ortaya çıkan serbest demir, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu nedenle demir vücutta serbest bırakılmamaya çalışılır (1,11,12).

Bakır da insanlar için oldukça önemli elementlerden olup, vücut için çok önemli fonksiyonları olan enzimlerin yapısında yer almaktadır. Bakır; inflamasyon, infeksiyon, kanser gibi durumlarda rol alan bir elementtir. Ayrıca immün sistemin fonksiyonları bakır eksikliği durumunda bozulmaktadır (2,12).

2.1. Demir Metabolizması:

Diyetle alınan demir, hayvansal kaynaklı hemoglobin ve myoglobinden alınan organik hem demiri ve et dışı kaynaklardan alınan inorganik (hem dışı) demir olmak üzere iki şekilde vücuda girmektedir. Demir, duodenum ve proksimal jejunumdan emilir. Besinlerle alınan demirin % 90'ı inorganik demirdir ve bu demirin sadece % 5'i emilmektedir. Hem demirin ise emilim oranı daha yüksek olup diyetle alınan demirin % 10'nunu oluşturmaktadır. Organik hem demirinin ve inorganik demirin barsaktan emilim şekilleri birbirinden farklı iken enterosit içinden plazmaya geçerken taşınma şekli birbirinin aynıdır (12,13).

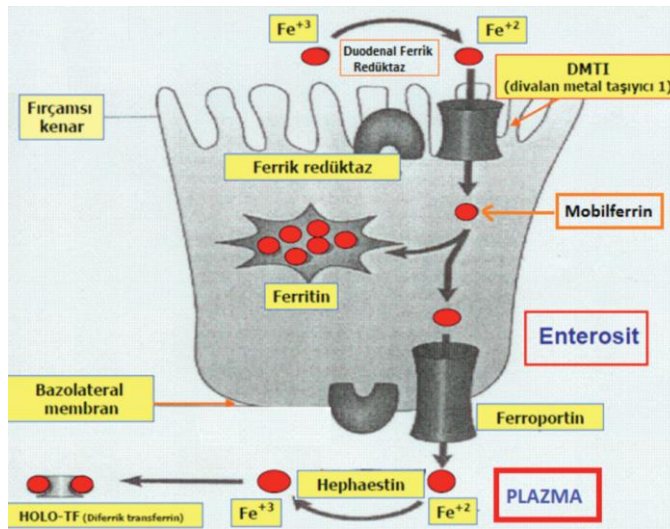
2.1.1. Organik Hem Demir Emilimi:

Vücut demirinin sağlanmasında hem demir çok önemlidir. Günlük demir gereksiniminin 2/3'ü etten alınan hem demir tarafından sağlanmaktadır. Ağızdan alınan heminin % 50'si organizmaya girmektedir. Hem demir emilimi diyetset faktörlerden ve

duodenal pH'dan bağımsızdır. Barsakta intestinal enzimler etten alınan hemoglobini globin ve heme kolayca parçalamaktadır. Hem demir Fe^{+2} formda bulunmaktadır ve hem taşıyıcı protein 1 adlı özel taşıyıcı protein ile duodenal enterosite girer. Enterositte plazmaya çıkarken ise inorganik demirle aynı yolu kullanır (14).

2.1.2. İnorganik (Hem Dışı) Demir Emilimi:

Besinlerle alınan hem dışı demir çoğunlukla Fe^{+3} şeklindedir. Demir proksimal duodenumdan emilmektedir. Duodenumdan emilimi için lümen içi pH'yı düşüren mide asiditesine ihtiyaç vardır. Ferrik demir membrana bağlı redüktaz olan askorbat bağımlı duodenal sitokrom b (Dcytb) tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenir. Ferröz demir olgun enterositin lümeneye bakan yüzeyinde bulunan "**divalan metal transporter 1**" (DMT1) ile enterosit içine alınır. DMT1 etkisini düşük pH'da gösterir. Demir eksikliği olan hayvanlarda DMT1 seviyesinin belirgin arttığı gösterilmiştir. DMT1 ayrıca çinko, bakır, kurşun, kobalt, mangan, kadmium gibi iki değerlikli metal iyonların da transportunu sağlamaktadır (12,15-19). Demir emiliminde rol oynayan proteinler şekil 1'de gösterilmiştir (19).



Şekil 1: Demir Emilimi

2.1.3. Hücresel Demir Alınımı:

Enterosite alınan demirin bir kısmı ferritin şeklinde depolanır ve demir gerekli olduğu zaman absorbe edilen demir, enterositin bazolateral tarafına taşınır ve ferroportin aracılığı ile plazmaya geçer. Plazmaya aktarılan Fe^{+2} , seruloplazmin analogu ve bir transmembran proteini olan hefaestin ile Fe^{+3} haline okside edilir ve apotransferrine yüklenir (20,21). Demir karaciğerden sentezlenen transferrin tarafından taşınır.

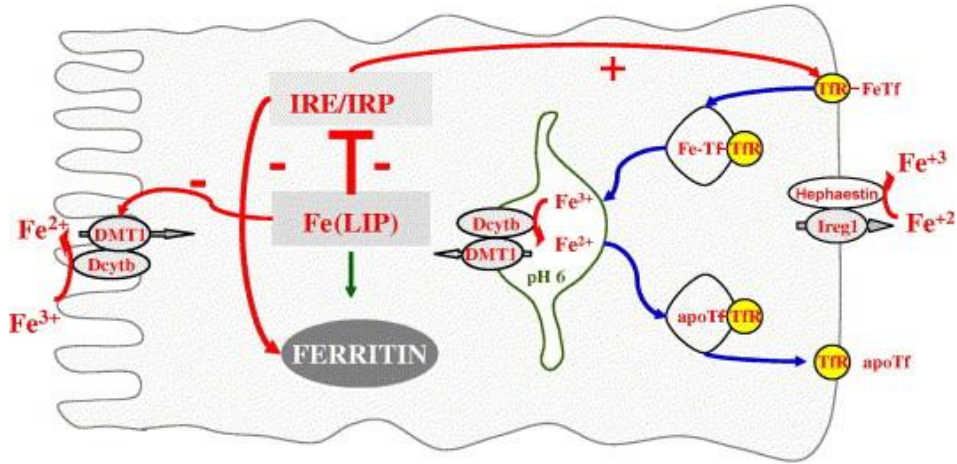
Transferrine bağlı demirin karaciğere alınabilmesi transferin reseptörü 1 (TfR1) ve transferin reseptörü 2 (TfR2) sayesinde olmaktadır. Hepatositler portal dolaşımdan aldıkları demiri depolarlar ve gerekli olduğunda ferroportin vasıtası ile tekrar dolaşıma verirler. TfR1 enterosit kript bazolateral kısımda ve demiri transferrinden alan tüm hücrelerde bulunur. TfR2 en çok karaciğerde, eritrositlerde ve duodenum kript hücrelerinde bulunur. Ayrıca demir depo sinyallerini karaciğere iletmede rolü vardır. Demirin fazla olduğu durumlarda karaciğer TfR1 düzeyi azalırken TfR2 düzeyi artmaktadır. Hemokromatozisli hastalardaki aşırı demir yüklenmesinden TfR2 geni mutasyonu sorumlu tutulmaktadır (2).

Dolaşımdaki yaşlı eritrositlerin fagosite olması sonucu hemoglobinden ortaya çıkan demiri makrofajlar alır ve makrofaj ferroportini sayesinde demir plazmaya verilir ya da ihtiyaç yoksa ferritin şeklinde depolanır. Makrofaj demirinin oksidasyonunda ve transferrine yüklenmesinde bakır bağımlı enzim olan seruloplazmin görev almaktadır (2,13,22,23).

2.1.4. Organizmada Demir Dengesi:

Demirin hücre içi dengesinin sağlanması ile ilgili tüm proteinlerin sentezi posttranskripsiyonel düzeyde hücre içi demir düzeylerine bağlı olarak düzenlenmektedir. İntestinal demir emilimi DMT1 ve ferroportin taşıyıcıları arasındaki denge ile sağlanır. Duodenumdan demir Dcytb enzimi aracılığı ile Fe^{+2} 'ye indirgenerek DMT1 ile duodenumdan hücre içine taşınır. Enterosit içindeki demir ferroportin aracılığı ile plazmaya geçerek Hefaestinle Fe^{+3} 'e okside edilir ve apotransferrine yüklenir. Hücre içi demir miktarının düzenlenmesinde sitoplazmada bulunan ve hücre içinde demiri hisseden, demir düzenleyici proteinler (IRP1, IRP2) ve demir düzenleyici elementler (IRE) çok önemlidir. Ferritin, ferroportin, delta aminolevulinik asit sentetazda IRE'ler mRNA'ların

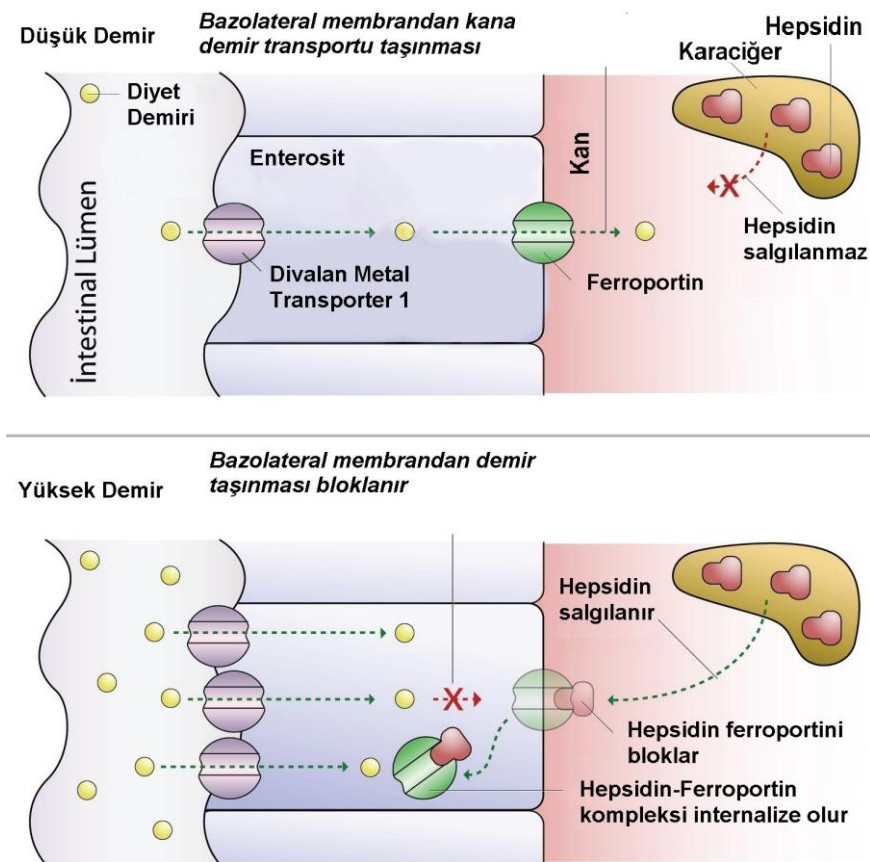
5' bölgesinde; TfR1 ve DMT1'de IRE'ler mRNA'ların 3' bölgesinde bulunur. Dolayısı ile bu iki farklı bölgeden bağlanma farklı etkilere neden olur. Hücre içi demir azaldığı zaman IRP'nin IRE'ye bağlanması artar. Bu bağlanmanın sonucunda DMT1 ve TfR artar ve IRP1 TfR bağlanır ve diğer taraftan ferritin, ferroportin ve delta aminolevulinik asit sentezini durdurur. Yüksek demir varlığında ise IRP yapısal olarak değişir ve IRE'lere bağlanamaz. Bunu sonucunda da DMT1 sentezi azalmakta, TfR mRNA stabilizasyonu bozulmakta ve enterosit içine demir girişi engellenmektedir. Demir alımı azalmasına bağlı olarak da ferritin sentezi artarak ortamda bulunan demir depolanmaya başlayacaktır. Yapılan hayvan deneylerinde, DMT1 sentezi azalırken, ferroportin sentezinin artışına bağlı demir birikimi olduğu izlenmiştir (2,12,13). Hücre demir hemostaz modeli şekil 2'de gösterilmiştir (2).



Şekil 2: Hücre Demir Hemostaz Modeli: IRP: Demir düzenleyici protein; IRE: Demir düzenleyici element; DMT1: divalent metal transporter 1; Dcytb: duodenal sitokrom b; TfR: transferin; TfR: transferin reseptörü; Ireg1: ferroportin.

Organizmada demir dengesi ayrıca hepsidin adı verilen ve karaciğerden sentezlenen bir hormon tarafından düzenlenmektedir (Şekil 3). Hepsidin demir miktarı arttığı zaman duodenal demir Emilimini, duodenum epitel hücre ve makrofajdan demir atılımını engelleyerek, organizma demirini azaltmaktadır. Hepsidininin bağlandığı ferroportin, bazolateral transmembran protein olup plasentada, barsakta, retiküloendotelial makrofajlarda ve hepatositlerde bulunur. Organizma demir depolarının azalması, hipoksi, eritropoetik aktivite artışı durumlarında karaciğerde hepsidin sentezi azalır. Enflamasyonda akut faz proteini olması dolayısı ile hepsidin sentezi artmaktadır.

Hepsidin yüksek demir durumunda salgılanır ve ferroportine bağlanır. Hepsidin-ferroportin kompleksi enterosit içine girer ve lizozomlarla parçalanır. Ferroportinin bazolateral membranın yüzeyinden kaybı sonucu demir plazmaya geçemez, sonuç olarak intestinal demir emilimi azalır, makrofajlarda ve enterositlerde demir birikimi artar. Demir miktarı azaldığı durumda ise hepsidin sentezi azalır ve ferroportin bazolateral membran yüzeyine doğru çıkar. Ferroportin aracılığı ile enterositte plazmaya demir geçişi artar (3,12,13,24,25). Hepsidin tarafından demir alınımının düzenlenmesi şekil 3'te gösterilmiştir (25).



Şekil 3: Hepsidin tarafından demir alınımının düzenlenmesi.

Hücreye giren demirin metabolik olarak aktif olmayan kısmı ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır. Memelilerin ferritin molekülleri H (ağır) ve L (hafif) protein gruplarından oluşan 24 subunitli heteropolimer yapısındadır. Bu ferritin zincirlerinden H ferritin ferooksidaz aktivitesi vardır. Bu aktivite sayesinde ferritin içinde Fe^{+2} , Fe^{+3} e dönüşebilmektedir. H subunit kalpte daha fazla bulunurken, L subunit de karaciğer ve

dalakta daha fazla bulunur. H subunit oranlarının artışı demirin kullanımının artışı ile, L subunit oranının artışı demir depolarının artışı ile ilgilidir (12,13,26).

2.1. 5. Demirin Fonksiyonları:

Vücuttaki demirin %70'i hemoglobinde, %25'i ferritin ve denatüre olmuş ferritin yapısındaki hemosiderinde, %3-4'ü miyoglobinde, %0.1'i sitokromlarda, %0.1'i demir-enzim komplekslerinde, %2'si hücreler arası sıvıda, % 0.1'i plazmada transferrine bağlı olarak bulunur (12,27). Demir içeren protein, enzimler ve fonksiyonları tablo 1'de gösterilmiştir (27).

Tablo 1: Demir içeren protein, enzimler ve fonksiyonları

Protein ve enzimler	Fonksiyonlar
Hemoglobin	Oksijen taşınması
Myoglobin	Kas kontraksiyonu için oksijen depolanması
Myeloperoksidaz	Bakteri öldürülmesi
Alfa gliserofosfat dehidrogeneaz	Egzersiz toleransı
Katalaz	Eritrosit peroksid üretimi
Sitokromlar	ATP üretimi, protein sentezi, elektron transportu
Ferritin	Demir depolanması
Hemosiderin	Demir depolanması
Mitokondrial dehidrogenaz	Elektron transportu
Monoamin oksidaz	Katekolamin metabolizması
Ribonükleotid reduktaz	Lenfosit DNA sentezi, doku büyümesi
Transferrin	Demir transportu
Ksantin oksidaz	Ürik asit metabolizması

2.2. Demir Eksikliği Anemisi

2.2.1. Demir Eksikliği Nedenleri:

Demir eksikliği anemisi nedenleri başlıca üç ana grup altında toplanabilir (12,13, 27).

a. Alım eksikliği ve ihtiyacın artması: Gelişmekte olan ülkelerde et tüketiminin çok az ya da hiç olmaması nedeni ile diyetle yeterli demir alınamamaktadır. Çocuklarda

özellikle erken doğan veya düşük doğum ağırlıklı bebeklerde hızlı büyümeye bağlı artan demir ihtiyacı karşılanamadığı için DEA görülmektedir.

b. Kan Kayıpları: Gastrointestinal sistemden olan kan kayıpları kronik DEA'nin sebeplerindendir. Peptik ülser, inflamatuvar barsak hastalıkları, meckel divertikülü, barsak polipleri bu kanamaların en sık nedenini oluşturmaktadır. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde geçirilen parazitik enfeksiyonlar, malarya enfeksiyonu da kronik kan kaybına bağlı anemiye sebep olmaktadır.

İnek sütü tüketimi de DEA'ne neden olmaktadır. İnek sütünün demir içeriği düşüktür, ayrıca kalsiyum ve kazeinopeptid içermesi nedeni ile de demir emilimi etkilenmektedir. Gastrointestinal sistemde tahrişe neden olarak kanamaya neden olmaktadır. Bu nedenle yaşamın ilk yılında inek sütü önerilmemektedir. Anemiye sebep olmaması için inek sütü tüketiminin 500 ml/gün miktarını geçmemesi önerilmektedir (12).

c. Emilim bozukluğu: Barsak kaybı, cerrahi girişimler, inflamatuvar barsak hastalıkları gibi nedenler demir emiliminin bozulmasına yol açabilmektedir. Ayrıca çinko, bakır, kurşun, kobalt, kadmiyum, mangan gibi mineraller demir ile yarışarak DE'ne neden olabilmektedir (12,13).

Demir eksikliği anemisi nedenleri aşağıda verilmiştir (12,27).

1. İhtiyacın artması

Diyetle yetersiz demir alınması

Büyüme (Düşük doğum ağırlığı, prematürite, ikiz eşi olma, adölozan, hamilelik)

Konjenital siyanotik kalp hastalıkları

2. Absorbsiyonun yetersiz olması

Kötü biyoyararlanım (absorbsiyon; hem demir > Fe^{+2} > Fe^{+3})

Antiasid tedavisi/gastrik pH'nın artışı

Fitatlar, taninler

Diğer metaller (kobalt, kurşun)

Enterositin absorbsiyon kapasitesinde bozulma

Malabsorbsiyon sendromları, çöliyak hastalığı

Helikobakter pylori enfeksiyonuna bağlı kronik gastrit

3. Demir Depolarının Yetmemesi

a. Gastrointestinal kan kayıpları

Epistaksis

Gastrit

Ülser

Meckel's divertikülü

İnek sütüne bağlı enteropati

Parazit, kancalı kurtlar

Varis, ösefagus varisleri

Polip veya tümörler

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

Arteriovenöz malformasyon

Kolon divertikülleri, divertikülit

Hemoroid

b. Vajinal kan kaybı

Menstrual kanamanın fazla oluşu

Tümörler

c. Üriner kan kaybı

Kronik infeksiyon

Tümör

Mikroanjyopatik hemolitik anemi

Hematüri

d. Pulmoner kan kaybı

Pulmoner hemosiderozis

Goodpasture sendromu

Tuberküloz

Bronşektazi

Ekstrakorporal membran oksijenasyonu

e. İnflamasyon, infeksiyon

f. Barsakta demir alımında defekt olması

g. Ekstrakorporal: Hemodiyaliz, travma

4. Eritroid hücelere yetersiz demir alınması;

Atransferrinemi

Anti-transferrin reseptör antikoları

5. Demirin anormal hücre içi transportu;

DMT1 mutasyonu

Hem biyosentezinde defekt

2.2.2. Demir Eksikliğinde Klinik Bulgular:

Demir çocukluk çağında tüm organların gelişimi için gerekli olan esansiyel bir elementtir. Yaşamın erken döneminde nöral myelinizasyonun sağlanmasına katkıda bulunarak beyin gelişimini sağlamaktadır. Büyüme ve immun fonksiyonların gelişimi için gereklidir. Çocukluk çağında hızlı büyümenin sonucu olarak demire olan ihtiyaç çok fazladır. Fakir toplumlarda etten fakir beslenmenin sonucu olarak DEA gelişmektedir (28-31). Tüm dünyada DEA % 46 oranında görülmekte iken. dünya çocuk nüfusuna göre gelişmiş ülkelerde %13, gelişmekte olan ülkelerde %51'dir. Bizim ülkemizde dört yaş altı çocuklarda DEA oranı % 48 olarak bildirilmiştir (1,11,12,32).

Çocukluk çağında günlük demir ihtiyacı 0.8-1 mg'dır. Diyetle alınan demirin % 10'u emilebildiği için günlük 8-10 mg demirin hergün alınması gerekmektedir (12,13,27).

Demir eksikliğinin en önemli bulgusu solukluktur. Buz, kağıt, toprak gibi olağandışı şeyleri yeme isteği olabilir. Hafif, orta şiddetli anemide (hemoglobin seviyesi 6-10 gr/dl) 2,3 difosfogliserat seviyeleri artarak aneminin etkisi azaltılmaya çalışılır. Çocukta sadece huzursuzluk gözlenebilir. Hemoglobin seviyesi 5 gr/dl'nin altına indiğinde huzursuzluk ve anoreksi artık belirgin hale gelir ve takibinde taşikardi, kalp dilatasyonu olur, sistolik üfürüm duyulabilir (13).

2.2.3. Demir Eksikliğinin Dokulardaki Etkisi:

1. Gastrointestinal sistem

-Anoreksi: En yaygın ve en erken semptomdur. Çocukluk çağında büyümenin durmasına neden olabilir.

-Pika: Buz ve toprak yeme

-Atrofik glossit

-Disfaji

- Gastrik asidin azalması
- Duodenojejunal mukoza atrofisi
- Disakkaridazın azalması
- Kadmiyum ve kurşun gibi metallerin emiliminin artması

2. Santral sinir sistemi

- İrritabilite
- Mental motor gelişimin yavaşlaması
- Bilişsel fonksiyonların azalması
- Katılma nöbetleri
- Papilödem

3. Kardiyovasküler sistem

- Kalp hipertrofisi
- Taşikardi
- Kalp yetmezliği

4. Kas-iskelet sistemi

- Myoglobin ve sitokrom c eksikliği
- Fiziksel performansta yetersizlik

5. İmmun Sistem

- Enfeksiyon sıklığında artış. Özellikle solunum yolu enfeksiyonları daha fazla görülür.
- T lenfosit fonksiyonlarında bozulma
- Granülositlerin öldürme fonksiyonlarında bozulma
- Lökositlerdeki myeloperoksidaz aktivitesinde azalma
- Kutanöz hipersensitivitenin azalması

6. Hücrelerdeki değişiklikler

- İnefektif eritropoez
- Otohemolizde artma
- Eritrosit ömrünün kısalması
- Hem üretiminin azalması
- Glutasyon peroksidaz ve katalaz aktivitesinin azalması sonucunda hücre membranında oksidatif hasar
- Kemik iliğinde DNA ve RNA sentezinde bozulma, hücrelerin büyümesi, DNA, RNA ve protein sentezinde bozulma.

2.2.4. Demir Eksikliği Anemisi Dönemleri ve Tanısı:

1. Prelatent Demir Eksikliği: Hemotokrit ve serum demir değerleri etkilenmeden demir depoları baskılanır. Serum ferritini düşük ölçülür. Bu durum DE olarak isimlendirilir.

2. Latent Demir Eksikliği: Retiküloendotelyal sistem makrofajlarında demir depoları baskılanmıştır. Birinci dönemdeki bulgulara ilave olarak serum demir düşük, serum demir bağlama kapasitesi (DBK) artmış, transferrin saturasyonu (TS) azalmıştır ancak hemotokrit değişmemiştir. Bu dönem rutin tarama sırasında fark edilir. Eritrosit sayısı düşmeye başlamıştır.

3. Demir Eksikliği Anemisi: Birinci ve ikinci dönemdeki bulgulara ilave olarak hemoglobin hastanın yaşına göre olması gereken değerden düşüktür (12,33). Solubil transferrin reseptörü artmıştır. Tranferrin normalde % 20-50 oranında doymuşken DEA'de % 15 veya altındadır. Demir hemoglobin sentezi için yeterli miktarda olmadığı için serbest eritrosit protoporfirini artar.

Erken DEA normositik normokromdur. Eksiklik ilerledikçe eritrosit boyutu normale göre küçülür ve hemoglobin içeriği azalır. Artan eksiklik ile eritrositler kötü şekilli ve deforme olurlar, mikrositoz, hipokromi, artmış eritrosit dağılım genişliği gösterirler. Sonuç olarak hipokrom mikrositer anemi ve anizositoz gelişir. Serum demir düzeyi günlük değiştiği için tanıda çok yardımcı olmayabilir. Genellikle DEA'de serum demir düzeyi 50 mg/dl altına inmiştir. Serum ferritin düzeyi vücut demir depolarını yansıtmakta olup DE'de miktarı azalmış bulunur. Ancak akut faz reaktanı olduğundan dolayı kronik enflamatuvar durumlarda da yüksek bulunabilir. Serum ferritin konsantrasyonunun <15 ng/mL olması DE tanısında % 59 sensitivite, % 99 spesivite göstermektedir (11,34-37).

Solubil transferrin reseptör düzeyi DEA için oldukça güvenilirdir. Doku DE'ni ferritinden önce gösterir ve DEA'de miktarı artar. Ancak enfeksiyon varlığında da DE mevcutsa miktarı artmış bulunabilir. ELİZA yöntemi ile çalışılmaktadır ve kliniklerde kolay kullanılabilir bir test olmamasından dolayı rutin olarak DEA tanısında kullanılmamaktadır (13,34).

Demir durumunun gösterilmesinde en iyi yöntemlerden birisi de kemik iliği incelemesidir. Kemik iliğinde DEA'de sitoplazmik maturasyonun bozulduğu ve demir miktarının azaldığı görülür. Kemik iliğinin Prusya mavisini ile boyanmasında demir

depolarında azalma saptanır. Ancak kemik iliğinin alınması zor ve ağrılı bir işlem olduğu için tanıda rutin kullanılmamaktadır (27,34).

2.2.5. Demir Eksikliği Anemisi Tedavisi:

Demir eksikliği anemisi saptandığında önce anemiye yol açan sebep bulunmalı ve sebebe yönelik tedavi yapılmalıdır. Küçük çocuklarda daha çok beslenme ile ilgili nedenler sık görülürken, büyük çocuklarda ise kan kayıpları ve emilim bozuklukları öncelikle araştırılmalıdır.

Demir tedavisi ağızdan verilir. Basit ferröz tuzları etkili ve ucuz tedavi sağlamaktadır. Demir eksikliği anemisinde 4-6 mg/kg/gün ferröz sülfat yemekten bir saat önce ya da yemekten 2 saat sonra, 2-3 dozda önerilir. Demir tedavisine yanıt retikülosit artışı ile izlenir ve tedaviden 5-7 gün sonra retikülosit krizi gözlenir. Retikülosit krizinden sonra hemoglobin günde 0.2-0.4 gr/dl artmaya başlar ve iki ay sonra hemoglobin seviyesi normale döner. Demir depolarının dolması için tedaviye hemoglobin normale geldikten sonra 2-3 ay daha devam edilmelidir (12,13).

İnflamatuvar barsak hastalığı, malabsorbsiyon gibi durumlarda ağızdan demir verilmesinin etkin olmaması nedeni ile parenteral demir tedavisi verilebilir. Demir dekstran intramuskuler, demir sukroz ve ferrik glukonat intravenöz kullanılan formlarıdır. Özellikle intravenöz formlar daha etkili olması sebebi ile böbrek yetmezliğine bağlı diyalize giren hastalarda yaygın kullanılmaktadır.

Demir eksikliği anemisinde kan transfüzyonu sadece anemiye bağlı kalp yetmezliği geliştiğinde yapılmalıdır (12,13,27).

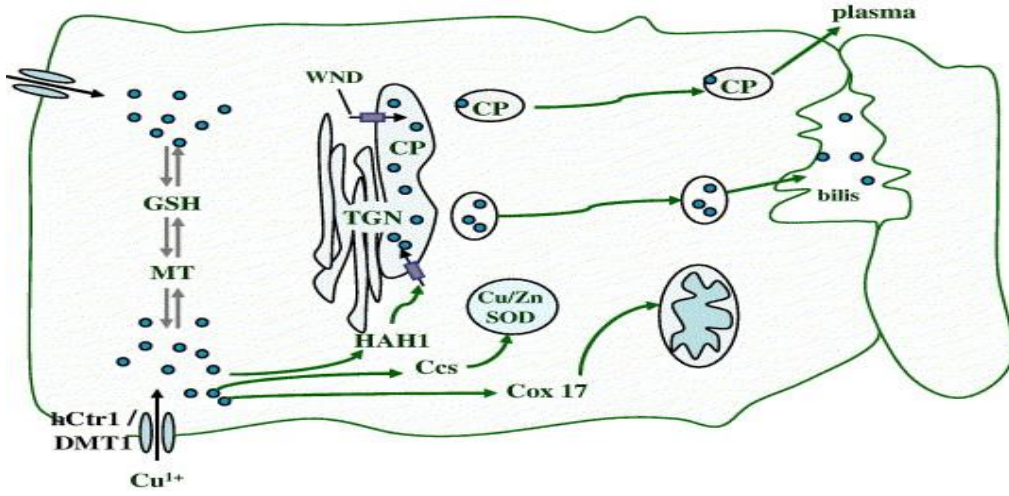
2.3. Bakır Metabolizması

2.3.1. Bakır Emilimi

Demir gibi bakır da metabolizma ve hücre büyümesi için esansiyel bir elementtir. Yetişkinlerde net bakır ihtiyacı 2-5 mg, büyümekte olan çocukların ise ihtiyacı 0.04-0.15 mg/kg'dır. Gastrointestinal yoldan diyetle alınan bakırın %30'u emilmektedir ve karaciğerde depolanmaktadır. Absorbe edilen plazma bakırının %10-15'i albumin ve aminoasidlere zayıf bağlı iken seruloplazmin plazmadaki bakıra daha güçlü bağlanmış durumdadır (2,12,38).

Bakırın barsaklardan emiliminde bakır transporter 1 (Ctr1) ve DMT1 rol oynar. Ctr1 intestinal hücrelerin fırçamsı kenarlarında bakırın taşınmasını sağlamaktadır. Memeli hücrelerinde deneysel olarak Ctr1'in bakırın intestinal hücreler tarafından alınımını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bazolateral membrandan bakırın kana geçişini de Ctr1 sağlamaktadır. Fırçamsı kenarda bulunan DMT1 demir, kadmiyum, mangan ve bakır için taşıyıcı olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda DMT1'in yapısının bozulması DMT1 ekspresyonunu etkilemekte sonuç olarak da demir ve bakırın taşınması bozulmaktadır (39,40). Karaciğer Coca-2 hücrelerinde yapılan deneysel çalışmada ortama demir ilave edildiğinde bakır alınımının azaldığı, ortama aşırı bakır eklendiğinde ise demir miktarının azaldığı izlenmiştir (2,41).

Memeli hücrelerinin içinde bakır taşınmasında görevli, bakır şperon proteinleri olarak adlandırılan, hem hücreye hem de enzime spesifik olarak bakır taşınmasını sağlayan moleküller vardır. Hücre içine alınmış olan bakırın golgi cisimciğine taşınmasını P tipi ATPaz olan HAH1/ATOX1 proteini sağlar. Enterositte bulunan tipi ATP7A (MNK)'dir ve bu proteinde defekt oluştuğunda Menkes hastalığı görülür. Karaciğerde bulunan tipi ATP7B (WND)'dir ve bu proteinde defekt oluştuğunda Wilson hastalığı görülür. Sitoplazma içindeki Ccs şperonu, bakır-çinko süperoksit dismutaz'a (Cu/Zn SOD) bakır taşır. COX17 şperonu ise mitokondriye COX enzimi için bakır taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. Ayrıca sitoplazmada bulunan metalotioninler ve glutatyonda bakır iyonları için önemli şperonlar olarak görev yapmaktadır (2,42). Karaciğerde bakır alımı ve metabolizmasının modeli şekil 4'te gösterilmiştir (2).



Şekil 4: Karaciğerde bakır alımı ve metabolizmasının modeli: Ctr1: Bakır transport protein; DMT1: divalen metal transporter; TGN: golgi cisimciği; MT: metallothionein, CP: seruloplazmin, HAH1, Ccs, Cox 17: Bakır şaperonları, GSH: Glutatyon.

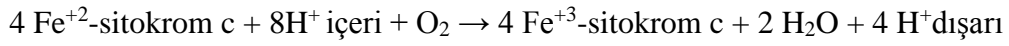
2.3.2. Bakırın Fonksiyonları:

Bakır; metabolizmada çok önemli görevleri olan superoksit dismutaz, sitokrom c oksidaz, lizil oksidaz ve seruloplazmin başlıca olmak üzere enzimlerin esansiyel kofaktörüdür (Tablo 2). Enfeksiyon ve enflamasyon durumunda demir azalırken, bakır ve seruloplazmin düzeyi artmaktadır. Bakır eksikliği durumunda immun cevapta yetersizlik görülmektedir. İnfeksiyon esnasında aktive lenfositlerde interlökin 2 üretimini sağlar. Kanserli hücrelerde Cu düzeyinin normal dokulara göre daha yüksek olduğu izlenmiştir (2,43).

Seruloplazmin bakır transport proteini olup hepatosit ve makrofajlarda depolanmış olan demirin salınması için demirin oksidasyon durumunun değişmesinde çok önemlidir. Seruloplazmin eksikliği olan insanlarda ve farelerde nörodejenerasyon, karaciğerde demir birikimi, diyabet, retikuloendotelial hücrelerin demiri yeniden kullanma fonksiyonunda kayıp ve orta derecede DEA'si geliştiği rapor edilmiştir (3,39). Demir emiliminde seruloplazmin analogu olan hefaestin de çok önemlidir. Farelerde yapılan deneylerde hefaestin DMT1 bağımlı intestinal demir alınımını artırdığı görülmüştür. Hefaestin eksikliğinde duodenal enterositlerde demir fazlalığı ve buna bağlı demir emiliminin azalması sonucu hipokrom mikrositer anemi geliştiği gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde

bakır eksikliği olduğunda diyetle alınan demirin emiliminin yeterli olmadığı izlenmiştir. Ayrıca bakır eksikliği olan hayvanlarda barsakta belirgin demir biriktiği saptanmıştır (2,40,44).

Mitokondride bulunan bir transmembran protein olan COX enziminin, bakır esansiyel komponentidir. COX, elektron transport zincirinin son basamağında görevlidir ve oksidatif ATP sentezi için esansiyel bir enzimdir (39). Sitokrom c 'nin dört molekülünden dört elektron alarak ve moleküler oksijeni iki su molekülüne çevirerek, elektron taşıma zincirinin terminal elektron alıcısı olur. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için demir molekülüne de ihtiyaç vardır (45).



Tablo 2: Bakır bağımlı enzimler ve fonksiyonları.

Enzim	Fonksiyonu	Eksikliğinde görülen bulgular
Sitokrom c oksidaz	Mitokondri solunum zincirinde elektron transportu, enerji üretimi	Beyin hasarı, hipotermi, kas hipotonisi
Lizil oksidaz	Kollajen ve elastin arasında çapraz bağ oluşumu	Arterial anormallikler, subdural hemoraji, herni, kemik fraktürü, deri ve eklem laksitesi
Dopamin beta hidroksilaz	Dopaminden norepinefrin üretimi	Hipotansiyon, hipotermi, diare
Tirozinaz	Melanin üretimi	hipopigmentasyon
Sulfidril oksidaz	Keratin çapraz bağları	Anormal saç
Cu/Zn superoksid dismutaz	Oksidan savunma, superoksid radikal oluşumunu önleme	Santral sinir sistemi dejenerasyonu
Seruloplazmin	Ferrooksidaz, bakır transportu	Anemi
Hefaestin	Enterosit içinde ferrooksidaz aktivitesi, demir absorpsiyonunda görevli	Anemi
Amin oksidaz	Primer aminlerin oksidasyonu, kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu	Karsinogenezis

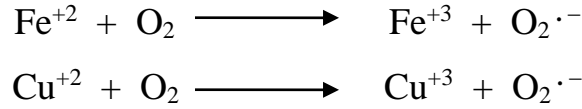
2.4. Demir ve Bakırın Serbest Radikaller Üzerine Etkisi

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri:

Moleküler oksijen (O_2), iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Eşleşmemiş elektron içeren atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Organizmada geçiş metallerini (demir ve bakır gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir.

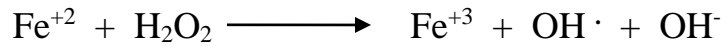
Moleküler oksijen, yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot)'dir.

Süperoksit radikali (O_2^-), hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (45).

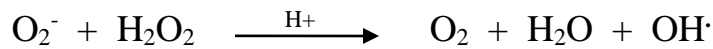


Hidrojen peroksit (H_2O_2), Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O_2^-) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH^\cdot) oluşturur.

Fenton Reaksiyonu:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Hidroksil radikali (OH^*), son derece reaktif bir oksidan radikalidir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali, oluştuğu yerde yeni radikallerin oluşmasına sebep olarak dokularda büyük hasara neden olur. Sonuç olarak serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve hasar oluştururlar (46-48).

Reaktif oksijen türleri oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya "antioksidanlar" olarak bilinirler.

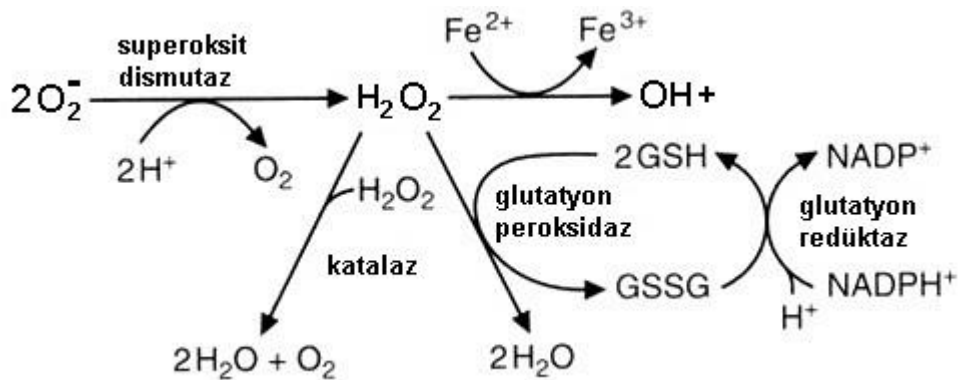
2.4.2. Demir ve Bakır Bağımlı Antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen yapısında bakır ve çinko içeren antioksidan enzimdir. Cu/Zn SOD sitozolde bulunur (46,49).

Katalaz (CAT)

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksisomlarda, daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar. Antioksidan enzimler ve fonksiyonları şekil 5'te gösterilmiştir (49).



Şekil 5: Antioksidan enzimler ve fonksiyonları

Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi (O_2^-) detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit (O_2^-) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin (O_2^-) zararlı etkilerine engel olurlar (46,50).

Seruloplazmin

Seruloplazmin SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferröz demiri (Fe^{2+}) ferrik demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

Transferrin

Transferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ferritin

Ferritin dokudaki demiri bağlar (49).

2.5. Demir ve Bakırın Mitokondride Enerji Metabolizmasındaki Rolü

2.5.1. Mitokondri Fonksiyonları

Mitokondri ökaryotik hücrelerin enerji üretimi görevini üstlenen kendi DNA'sına sahip sitoplazmik bir organeldir, sayıları enerji ihtiyacına göre, hücreden hücreye değişir ve 1-7 mikrometre uzunluğunda çubuk şeklinde veya 2-3 mikrometre çapında küresel yapılardır.

Her insan hücresinde yaklaşık 1700 mitokondri bulunur. Mitokondri dış zar, iç zar, krista (iç zar kıvrımları) ve matriks olmak üzere dört bölümden oluşur. Solunum zincirine ilişkin enzimler iç mitokondri zarında gömülüdürler ve hayvan hücreleri ATP'sinin çoğunu üreten oksidatif fosforilasyon burada gerçekleştirilir. Mitokondri matriksinde, pirüvat ve yağ asitleri asetil CoA'ya çevirilir ve asetil CoA sitrik asit siklusuna girer. Bu oksidasyon reaksiyonları ile büyük miktarlarda NADH ve FADH₂ üretilmektedir. NADH ve FADH₂ ile taşınan reaktif elektronlar ile moleküler oksijenin birleşmesinden elde edilebilir enerji, mitokondri iç zarında yer alan solunum zincirinde, elektron transport zinciri ile kazanılmaktadır.

Farklı absorpsiyon spektrumuna sahip olmaları nedeniyle sitokrom a, b ve c diye adlandırılan üç farklı sitokrom bulunmaktadır (51).

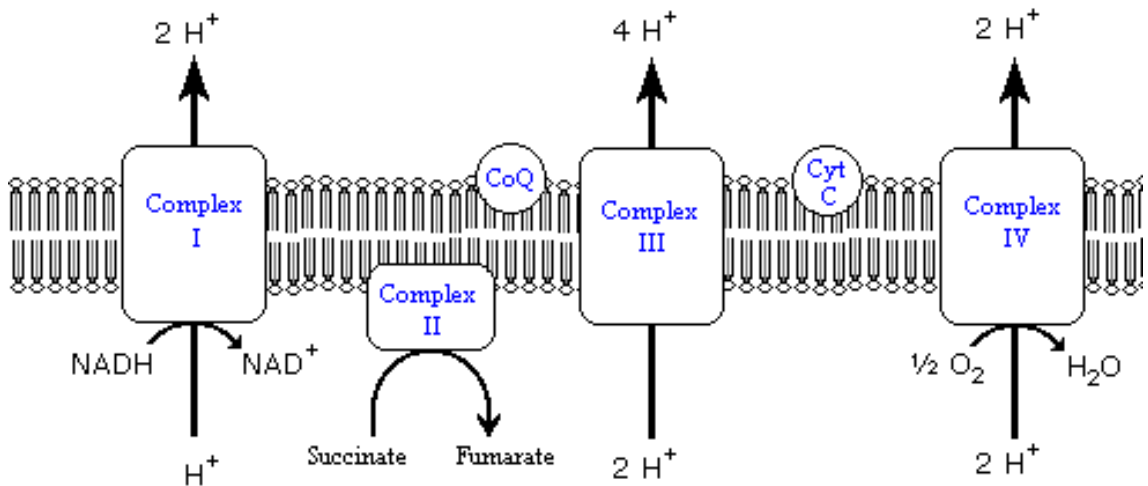
2.5.2. Elektron taşıyıcıları:

1. Sitokromlar; sahip olduğu demir atomu, ferrik oksidasyon durumundan (Fe^{3+}) ferröz oksidasyon durumuna (Fe^{2+}) değişen bir hem grubu içerir. Bu hem grubu, bir karenin köşelerindeki dört azot atomu ile tutulan bir demir atomuna sahip porfirin halkasından oluşur.

2. Demir sülfür proteinleri; elektron taşıyıcılarının ikinci ana grubudur. Bu proteinlerde protein üzerinde bir demir sülfür merkezi oluşturan iki veya dört demir atomu eşit sayıda sülfür atomuna ve sistein yan zincirlerine bağlanmıştır. Solunum zincirinde sitokromlardan daha çok demir sülfür merkezleri vardır.

3. Ubikinon (koenzim Q); Solunum zincirindeki elektron taşıyıcıların en basit olanıdır ve protein kısmı yoktur. Bir kinon (Q) bir veya iki elektron alır veya verir; indirgenmiş durumda taşıdığı her elektronla birlikte ortamdan bir proton alır.

Mitokondri iç membranındaki solunum zinciri, NADH'tan oksijene olan yolda içlerinden elektronların geçtiği 4 adet solunum enzim kompleksi içerir (45,51). Solunum enzim kompleksi içinden elektronların izlediği yol şekil 6'da gösterilmiştir (45).



Şekil 6: Solunum enzim kompleksi içinden elektronların izlediği yol.

1.NADH dehidrogenaz kompleksi (kompleks I); Kırktan fazla polipeptid zinciri içeren NADH dehidrogenaz kompleksi (kompleks I) solunuma ilişkin enzim komplekslerinin en büyüğüdür. Bu kompleks NADH'tan elektronları alır ve bir flavin ve en az yedi demir sülfür merkezleri yolu ile ubikinona geçirir. Ubikinon sonra kendi elektronlarını ikinci bir solunum enzim kompleksine, sitokrom b-c1 kompleksine transfer eder.

2. Süksinat dehidrogenaz kompleksi (Kompleks II); FADH₂ yapısındaki elektronların ubikinona (koenzim Q) transferini sağlar.

3. Sitokrom b-c1 kompleksi (Kompleks III); On bir farklı polipeptid zinciri içerir ve bir dimer olarak iş görür. Her bir monomer sitokromlara bağlı üç hem ve bir demir sülfür proteini içerir. Bu kompleks elektronları ubikinondan alır ve bu elektronları, elektronlarını sitokrom oksidaz kompleksine taşıyan sitokrom c'ye geçirir.

4. Sitokrom oksidaz kompleksi (Kompleks IV); bir dimer olarak iş görür, her bir monomer iki sitokrom (sitokrom a, sitokrom a₃) ve iki bakır atomu içeren 13 farklı polipeptid zincirlerinden oluşur. Bu kompleks sitokrom c'den her seferinde bir elektron kabul eder ve oksijene bir seferde dört elektron geçirir (45).

Demir ve bakır insan vücudu için çok önemli iki element olup eksiklikleri durumunda hücre fonksiyonları çok etkilenmektedir. Özellikle insan vücudu için çok önemli olan enerji metabolizmasında aktif rol oynamaktadırlar. Bizim çalışmamızda DE ve DEA'de yapısında demir içeren CAT ve yapısında bakır içeren ve etkisini demir varlığında gösteren COX enzimlerinin mitokondride aktivitesi bakılarak, demirin mitokondriyal enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL-METOD

Bu klinik çalışma; 2012-2013 yılları arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı tarafından planlanıp, KTÜ Yerel Etik Kurul Başkanlığından etik kurulundan izin (dosya no: 2011/104, karar no:579) alındıktan sonra, Biyokimya Anabilim Dalı ile ortaklaşa olarak yapıldı. Çalışmaya alınan her çocuk için yasal velilerinden “bilgilendirilmiş olur “ alındı. Çalışmamız, KTÜ Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklendi (proje kodu: 2010.114.003.10).

GRUPLARIN SEÇİMİ:

Çalışmaya 24 ay-17 yaş grubunda bulunan ve en az üç aydır demir tedavisi almayan, demir metabolizmasını etkileyen akut ve kronik hastalığı bulunmayan DE veya DEA’li hastalar dahil edildi. Hastalar; tam kan sayımı, serum demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin düzeyleri alınarak değerlendirildi.

Ferritin düzeyindeki yüksekliğin enflamasyon veya enfeksiyona bağlı olup olmadığını ayırımı için CRP bakıldı. CRP 0.5< değerler normal kabul edildi.

Grup 1(Kontrol): Yaşları ve cinsiyetleri çalışma koşullarına uygun, demir metabolizmasını etkileyen akut ve kronik hastalığı bulunmayan, hemoglobin değeri yaşına göre normal persentil aralığında, ferritin düzeyi 15 ng/ml’nin üstünde ve TS %15’in üstünde olan 70 çocuk **kontrol** grubu olarak alındı. Yaşa uygun hemoglobin değerleri tablo 3’te verilmiştir (32).

Grup 2 (DE): Hemoglobin değeri kendi yaşına göre normal persentil aralığında, ferritin düzeyi 15 ng/ml’nin altında ve/veya TS %15’in altında olan vakalar **DE** olarak kabul edildi (1,11,33).

Grup 3 (DEA): Hemoglobin değeri kendi yaşına göre düşük persentilde, ferritin düzeyi 15 ng/ml’nin altında ve/veya TS %15’in altında olan vakalar **DEA** olarak kabul edildi (1,11,33).

Tablo 3: Yaşa göre normal hemoglobin değerleri

yaş	Hemoglobin (gr/dl)		Hematokrit (%)		Eritrosit sayısı (10 ¹² /L)	
	ortalama	-2SD	ortalama	-2SD	ortalama	-2SD
Kordon kanı	16.5	13.5	51	42	4.7	3.9
1-3 gün	18.5	14.5	56	45	5.3	4.0
1 hafta	17.5	13.5	54	42	5.1	3.9
2 hafta	16.5	12.5	51	39	4.9	3.6
1 ay	14.0	10.0	43	31	4.2	3.0
2 ay	11.5	9.0	35	28	3.8	2.7
3-6 ay	11.5	9.5	35	29	3.8	3.1
0.5-2 yaş	12.0	10.5	36	33	4.5	3.7
2-6 yaş	12.5	11.5	37	34	4.6	3.9
6-12 yaş	13.5	11.5	40	35	4.6	4.0
12-18 yaş						
Kadın	14.0	12.0	41	36	4.6	4.1
Erkek	14.5	13.0	43	37	4.9	4.5
18-19 yaş						
Kadın	14.0	12.0	41	36	4.6	4.0
Erkek	15.5	13.5	47	41	5.2	4.5

Demir eksikliği grubunda 70, DEA grubunda 70, kontrol grubunda 70 olmak üzere toplam 210 vaka çalışmaya alındı. Her vakadan bir kez kan örneği alındı. Tüm vakaların **bakır** düzeyi ve periferik kan lenfosit mitokondrilerinde **CAT** ve **COX** enzim aktiviteleri çalışıldı.

BAKIR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ:

Bakır, Perkin Elmer a Anayst 800 cihazında serumda atomik absorpsiyon yöntemi ile bakıldı. Sonuçlar µg/dL olarak verildi. Tüm vakaların bakır düzeyi çalışıldı ancak, kontrol grubunda 1, DE grubunda 6, DEA grubunda 11 vakanın bakır düzeyi kan örneklerinin yetersiz miktarda olmasından dolayı değerlendirilemedi. Sonuçta kontrol grubunda 69, DE grubunda 64, DEA grubunda 59 vakanın bakır düzeyi sonuçları değerlendirmeye alındı.

COX VE CAT EZİM AKTİVİTELERİ TAYİNİ

Hastaların periferik kan lenfositlerinden elde edilen mitokondrilerde COX ve CAT enzim aktivite tayini yapıldığından dolayı, ilk önce vakaların periferik kanlarından lenfosit izolasyonu yapıldı.

Lenfosit izolasyonu:

Hasta gruplarından alınan kanlardan lenfosit izolasyonu; Biochrom, Biocoll separating solution (Density 1,077g/ml, Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Israel, L6113) kullanılarak dansite gradient ayrılma prensibine göre aşağıda açıklandığı şekilde yapıldı.

1. Örneklerin Hazırlanması:

Lenfosit izolasyonu için 8-10 ml kan örneği alındı. Kan örnekleri hastalardan alındıktan sonra aynı gün lenfosit izolasyonu yapılmasına özen gösterildi, istisnai durumlarda hasta kanları maksimum bir gün +4 °C'lik buzdolaplarında saklandı ve izolasyondan 15-20 dakika önce oda sıcaklığına çıkarıldı. Kan örnekleri 1:1 oranında PBS ile kan tûpünü yavaşça alt üst etmek suretiyle dilüe edildi.

2. Mononükleer Hücrelerin Toplanması:

45 mL'lik santrifüj tüplerine, dilüe kan hacimlerine göre 7-10 mL arasında Biocoll Solüsyonu eklendi. Dilüe edilmiş kan, 45 ° eğik tutulan santrifüj tüpüne ayırma solüsyonu ve kan birbirine karışmayacak şekilde yavaşça eklenerek 1200g hızda +4 °C'de 20 dakika frensiz modda santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra kan örneği, plazma ve ayırma solüsyonu arasında kalan % 70-100 oranında lenfosit içeren tabaka olacak şekilde ayrıldı. Lenfosit içeren buffy-coat tabakası pipetle plazmaya karıştırılmadan dikkatlice ayrılarak, ayrı bir tüpte toplandı.

3. Hücrelerin Yıkanması:

Elde edilen hücreler; 2 kez PBS tamponu ile yıkanarak sırasıyla +4'ye soğutulmuş santrifüjde 300g'de 10 dakika ve 200g'de 10 dakika frenli modda santrifüj edilerek daha saf bir şekilde lenfosit ayrımı tamamlanmış oldu. Tüm 210 vakanın lenfositleri izolasyon işlemine tabi tutuldu, ancak 10 vakanın kan örneğinin yetersiz olması, alınan kan örneğinin hemolizli olmasından dolayı lenfositleri izole edilemedi.

Elde edilen lenfositler hücre kültür mediumu (RPMI, Cat. no: 01-106-1B, Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Israel) ve %10 oranında dimetil sülfoksit (DMSO, Cat. no: 472301, Sigma-Aldrich) eklenerek -80 °C'de dondurularak mitokondri izolasyonu yapılana kadar saklandı.

Mitokondri İzolasyonu:

Mitokondri izolasyonu temel olarak:

- a. Hücrelerin mekanik veya kimyasal olarak parçalanması/ hücre zarının parçalanması
- b. Diğer organelleri uzaklaştırmak için düşük hızda değişen santrifügasyon
- c. Mitokondrilerin ayırımı için yüksek hızda santrifüj aşamalarından oluşmaktadır.

Erkeklerin kas kitlesinin kızlardan fazla olması sebebi ile mitokondri sayısı erkek cinsiyette daha fazladır (51). Bu nedenle, bizim çalışmamızda da lenfosit izolasyonu yapıldıktan sonra vakalar cinsiyetlerine göre kız ve erkek olarak ayrılarak mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Mitokondri izolasyonu yapılabilmesi için en az 2×10^8 lenfosit bulunması gerekmektedir. Her vakadan ayrı ayrı mitokondri izolasyonu yapmak için gerekli olan 2×10^8 lenfosit sayısını sağlayabilmek için 40 ml kan alınması gereklidir. Biz çocuk vakalardan en fazla 8-10 ml kan alabildik. Bundan dolayı, mitokondri izolasyonu yapılabilmesi için gerekli olan en az 2×10^8 lenfosit sayısını sağlayacak şekilde, hemoglobin değerleri birbirine yakın aynı gruptan ve aynı cinsiyetten vakalar en az 3, en fazla 8 kişi olacak şekilde gruplandırıldı. Böylece total olarak 200 hastadan izole edilen lenfositlerden oluşturulan hasta ve kontrol havuzlarından her bir grupta ayrı ayrı mitokondri izolasyonu yapıldı.

Lenfosit izolatlarından mitokondri izolasyonu, mitokondri izolasyon kiti (Cat. no: ab110171, ABCAM, Amerika) ile yapıldı. Kitin içerisinde 50 ml Reaktif A, 50 ml reaktif B, 10 ml Reaktif C ve homojenizatör bulunmakta idi. Hücre kültür mediumu uzaklaştırılarak lenfositler toplandı. Hücreleri parçalamak /membranlarını zayıflatmak amacıyla dondurulup çözüldü. Mitokondrilerin protein konsantrasyonları Lowry yöntemi ile ölçüldü (53). İzolasyon kiti içinde bulunan Reaktif A içerisinde her mililitresinde 5 mg protein konsantrasyonu olacak şekilde hücreler süspansiyon edildi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Donunca, homojenizatör yardımıyla süspansiyon iyice homojenize edildi ve +4 °C'de 1000g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak muhafaza

edildi. Kalan pellet izolasyon kiti içinde bulunan Reaktif B içerisinde süspansiyon edilerek her mililitresinde 5 mg protein konsantrasyonu olacak şekilde hücreler süspansiyon edildi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Donunca, homojenizatör yardımıyla süspansiyon iyice homojenize edildi ve +4 °C'de 1000g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak muhafaza edildi. Toplanan süpernatantlar iyice karıştırıldı ve +4 °C'de 12000g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra pelletler toplandı. Toplanan pellet proteaz inhibitör kokteyli (PI) (sigma P8340, Cat. no: ab65621) içeren Reaktif C içerisinde resüspansiyon edilerek, çalışılincaya kadar -80 °C'de saklandı (54).

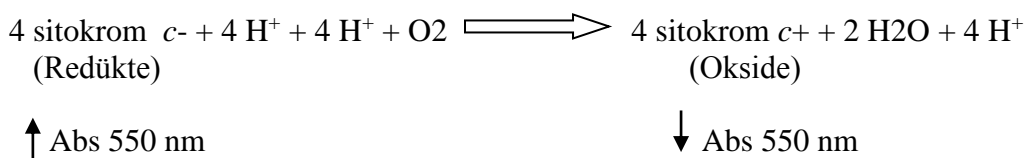
Lowry Protein Tayini:

Örneklerdeki protein tayini Lowry metodu kullanılarak tayin edildi. Bu yöntemin prensibi alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturularak Cu^{+1} e indirgenmesi, bu indirgenmiş bakır iyonunun ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitlerinin Folin-Fenol reaktifini indirgemesiyle renk oluşumuna neden olması ve oluşan rengin 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (53).

COX Enzimi Aktivite Tayini:

Mitokondriyal solunum zinciri kompleks IV (sitokrom oksidaz, COX), aktivite tayini Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay Kit (Cat. no: ab109909, ABCAM, Amerika) kullanılarak yapıldı. Aktivite tayini için protein konsantrasyonları, kitte mitokondri izolatları için önerilen protein konsantrasyon aralığına göre ayarlandı ve Molecular Devices, Versamax Microplate Reader markalı spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okundu.

COX enziminin aktivite oranı sitokrom c'nin oksidasyonunun başlangıç hızı olarak ifade edilir. Redükte (SitC^{+3})'nin, okside (SitC^{+2})'ye dönüşümü esnasında 550 nm'de absorbansında azalma olmaktadır. Oksidasyon gerçekleştikçe absorpsiyondaki azalma lineer bir grafik oluşturur.



COX enzim aktivite tayini 550 nm'de ölçülen ilk absorbans ile ikinci absorbans arasındaki farkın arada geçen zamana bölünmesi ile elde edildi.

$$\text{COX Aktivite: } \frac{\text{İlk absorbans}-\text{İkinci absorbans}}{\text{Arada geçen zaman}}$$

Aktivite sonuçları dakika başına miliunit, mOD/dk olarak verildi. Mitokondrileri izole edilmiş 200 vakanın COX enzim aktivitesi ölçüldü.

CAT Enzimi Aktivite Tayini:

CAT enzimi aktivite tayini Mitosciences, Catalase Specific Activity Assay Kit (Cat. no:ab118184, ABCAM, İstanbul-Türkiye) kullanılarak yapıldı. Aktivite ölçümü lüminesans olarak Molecular Devices SpectraMax markalı multi-mode microplate reader cihazında kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Aktivite tayini için protein konsantrasyonları, kitte önerilen protein konsantrasyon aralığına göre ayarlandı. Aktivite sonuçları, enzim aktivite grafiğindeki Vmax değerlerine göre verildi. Demir eksikliği grubunda 6 vakanın enzim aktivitesi ölçülemedi. CAT enzim aktivitesinin ölçülememe nedeninin çalışma koşullarından etkilenmesi olabileceği düşünüldü.

SERUM DEMİR VE SERUM DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ TAYİNİ:

Hastaların demir ve serbest DBK değerleri fotometrik renk ölçüm yöntemiyle Beckman Coulter AU5800 cihazında, cihazın orijinal kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar µg/dL olarak verildi.

Total DBK aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Total DBK} = \text{Serbest DBK} + \text{Demir}$$

FERRİTİN TAYİNİ:

Ferritin değerleri Beckman coulter DXI800 cihazında, kemilüminesans immünoanaliz yöntemiyle firmanın orijinal kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar ng/mL olarak verildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiksel analizler “SPSS 13 (Statistical Package for Social Scruenu) for Windows©” paket programı kullanılarak bilgisayarda yapıldı. Üçlü grupların karşılaştırılmasında normal dağılıma uyuyorsa Anova testi, normal dağılıma uymuyorsa Mann-Whitney U testi yapıldı. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma (ort \pm ss) olarak ifade edildi ve $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grupların kendi içinde karşılaştırılması için korelasyon-regresyon analizi yapıldı. Normal dağılıma uyuyorsa Pearson, normal dağılıma uymuyorsa Sperman testi yapıldı. Korelasyon-regresyon analizi sonuçları 0.0-0.25 ilişki yok, 0.25- 0.50 zayıf-orta ilişki, 0.50-0.75 iyi ilişki, 0.75- 0.10 çok güçlü ilişki olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubunun yaşları 2-16 (10.2 ±4.4) yıl arasında değişiyordu. Vakalar 35 kız, 35 erkekten oluşuyordu. Hemogloblin 11.5-16.1 (12.8±1.1) gr/dL; OEV 75-94 (82.1±4.6) fL; serum demir 51-212 (97.9±33.4) µg/dL; serum DBK 158-483 (339.1±60.2) µg/dL; TS % 15-92 (29.7±13.0); serum ferritin 17-190 (43.6±34.1) ng/mL; bakır 10-213 (72.1±46.7) µg/dL; COX enzim aktivitesi 0.4-4.6 (2.4±1.3) mOD/dk; CAT enzim aktivitesi 14,582-57,639 (35,097.9±12,598.6) Vmax idi. Kontrol grubunda serum numunesi yetersiz olduğu için bir vakanın bakır düzeyi, lenfosit izolasyonu yapılamadığı için iki vakanın COX enzim aktivitesi ve iki vakanın CAT enzim aktivitesi çalışılmadı.

Demir eksikliği grubunun yaşları 2-17 yıl (8.7±5.1) arasında idi. Vakaların 33'ü kız, 37'si erkekten oluşuyordu. Hemogloblin 11.5-14.6 (12.2±0.7) gr/dL, OEV 71-91 (79.5±4.2) fL, serum demir 21-155 (54.8±23.4) µg/dL, serum DBK 277-571 (383.9±73.5) µg/dL, TS % 7-38 (13.7±6.6), serum ferritin 3.4-14.0 (10.6±3.1) ng/mL, bakır 16-281 (106.9±55.5) µg/dL, COX enzim aktivitesi 0.3-3.7 (2.0±0.9) mOD/dk, CAT enzim aktivitesi 12,500-63,466 (30,269.9±12,259.1) Vmax idi. Demir eksikliği grubunda serum numunesi yetersiz olduğu için 6 vakanın bakır düzeyi, 6 vakanın lenfosit izolasyonu yapılamadığı için CAT enzim aktivitesi çalışılmadı.

Demir eksikliği anemisi grubunun yaşları 2-17 yıl (8.2 ±5.8) arasında idi. Vakaların 33'ü kız, 37'si erkekten oluşuyordu. Hemogloblin 5.5-11.7 (9.6±1.5) gr/dL, OEV 56-78 (65.8±10.3) fL, serum demir 11-107 (28.4±16.3) µg/dL, serum DBK 262-549 (431.1±69.3) µg/dL, TS %1-27 (6.3±4.2), serum ferritin 1.4-14.6 (6.8±4.2) ng/mL, bakır 13-220 (115.1±50.2) µg/dL, COX enzim aktivitesi 0.4-4.7 (2.9±1.2) mOD/dk, CAT enzim aktivitesi 16,848-58,333 (31,978.9±11,173.3) Vmax idi. Demir eksikliği anemisi grubunda serum numunesi yetersiz olduğu için 11 vakanın bakır düzeyi, lenfosit izolasyonu yapılamadığı için 8 vakanın COX enzim aktivitesi ve 8 vakanın CAT enzim aktivitesi çalışılmadı.

Sözkonusu vakaların lenfosit izolasyonu, kan örneklerinin hemolizli olması veya kan miktarının yeterli olmaması sebebi ile yapılamadı.

Tablo 4'te tüm grupların laboratuvar bulguları verilmiştir.

Tablo 4: Grupların laboratuvar bulguları

	Kontrol				Demir Eksikliği				Demir Eksikliği Anemisi			
	n	min	mak	Ort ± SS	n	min	mak	Ort ± SS	n	min	mak	Ort ± SS
Hb (gr/dL)	70	11.5	16.1	12.8±1.1	70	11.5	14.6	12.2±0.7	70	5.5	11.7	9.6±1.5
OEV (fL)	70	75	94	82.7±4.6	70	71	91	79.5±4.2	70	56	78	65.8±10,3
Lenfosit	70	1,300	5,500	2,770.0±940.8	70	1,200	7,600	3,085.7±1,283.6	70	1,000	7,100	3,268.6±1,342.7
CRP (mg/dL)	70	0.1	0.1	0.1±0.0	70	0.1	0.1	0.1±0.0	70	0.1	0.1	0.1±0.0
Demir(µg/dL)	70	51	212	97.9±33.4	70	21	155	54.8±23.4	70	11	107	28.4±16.3
DBK (µg/dL)	70	158	483	339.1±60.2	70	277	571	383.9±73.5	70	262	549	431.1±69.3
Ferritin	70	17.00	190.00	43.6±34.1	70	3.4	14.0	10.6±3.1	70	1.4	14.6	6.8±4.2
TS (%)	70	15	92	29.7±13.0	70	7	38	13.7±6.6	70	1	27	6.3±4.2
Bakır (µg/dL)	69	10	213	72.1±46.7	64	16	281	106.9±55.5	59	13	220	115.1±50.2
COX	68	0.4	4.6	2.4±1.3	70	0.3	3.7	2.0±0.9	62	0.4	4.7	2.9±1.2
CAT (Vmax)	68	14,582	57,639	35,097.9±12,598.6	64	12,500	63,466	30,269.9±12,259.1	62	16,848	58,333	31,978.9±11,173.3

Hb: Hemoglobin, OEV: Ortalama eritrosit volümü, CRP: C reaktif protein, DBK: Demir bağlama kapasitesi, TS: Transferrin saturasyonu, COX: Sitokrom c oksidaz, CAT: Katalaz, n: Vaka sayısı, Min: Minimum, Mak: Maksimum, Ort ± SS: Ortalama ± Standart Sapma

Grupların bakır düzeyleri, COX ve CAT enzim aktiviteleri tablo 5’de görülmektedir.

Tablo 5: Grupların serum bakır düzeyleri, COX ve CAT enzim aktiviteleri ortalamaları

Gruplar	Analizler		
	Bakır ($\mu\text{g/dL}$)	COX (mOD/dk)	CAT (Vmax)
Kontrol	72.1 \pm 46.7 ^a	2.4 \pm 1.3 ^d	35,097.9 \pm 12,598.6
DE	106.9 \pm 55.5 ^b	2.0 \pm 0.9 ^e	30,269.9 \pm 12,259.1
DEA	115.1 \pm 50.2 ^c	2.9 \pm 1.2 ^f	31,978.9 \pm 11,173.3

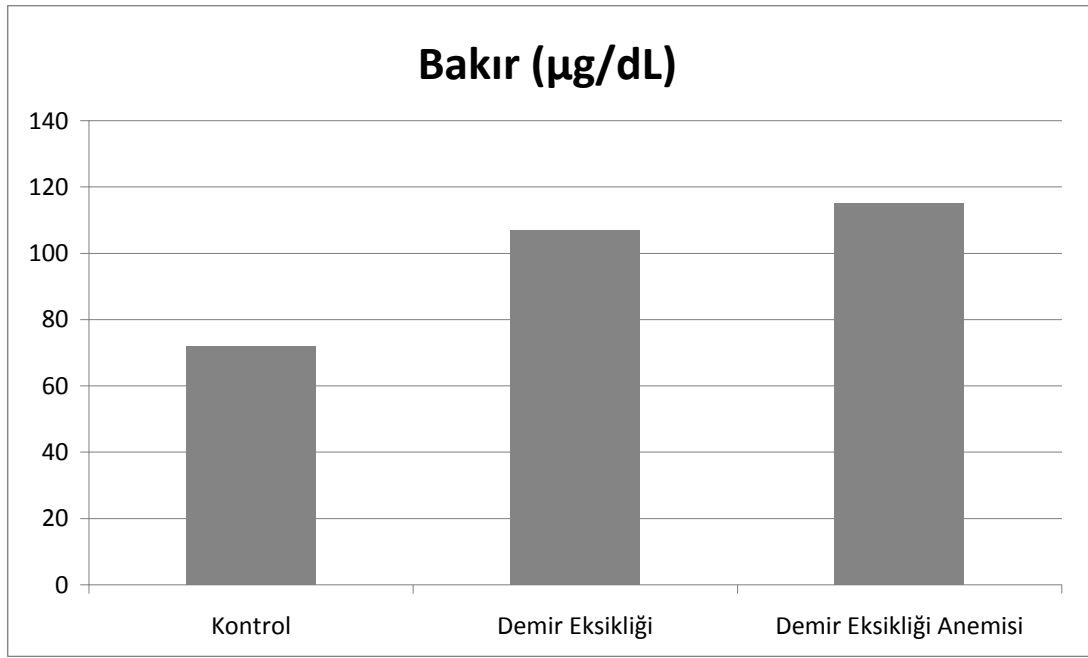
p<0.05: a-b, a-c, d-f, e-f

Üç grup arasında CAT enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark gösterilemedi (p=0.09). Ancak sayısal olarak CAT enzim aktivitesi DE ve DEA grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olarak izlendi. En yüksek CAT aktivitesi kontrol grubunda tespit edildi.

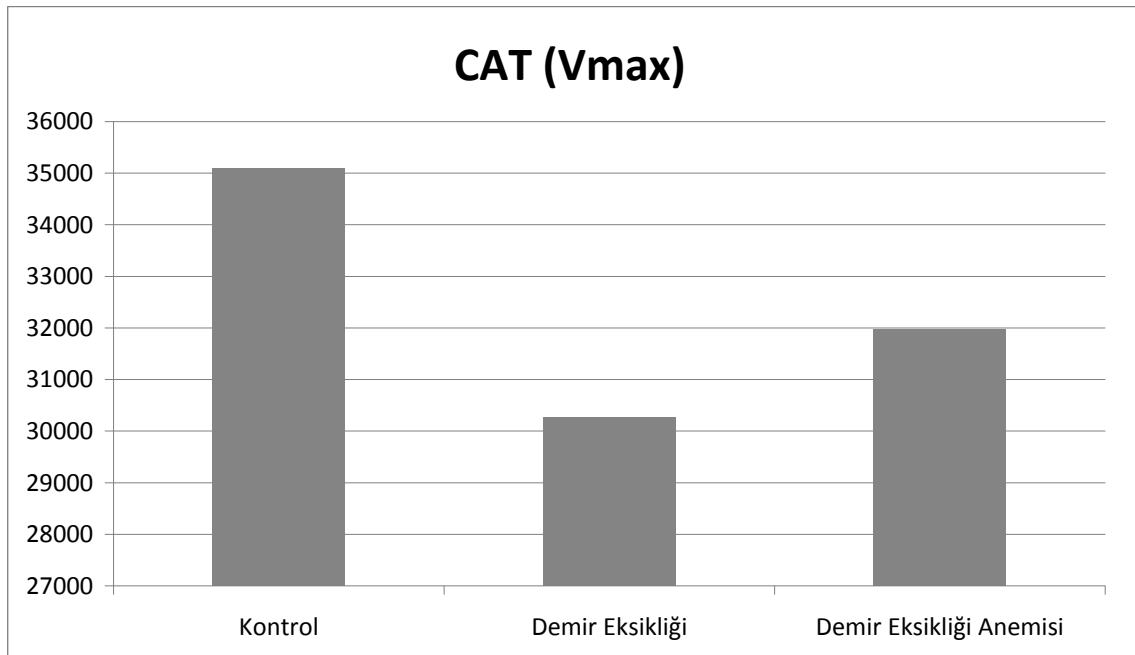
Üç grup arasında serum bakır düzeyleri arasında istatistiksel fark izlendi (p=0.000). Bakır düzeyi DE ve DEA olan grupta kontrol grubuna göre yüksek olarak izlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırası ile p=0.000, p=0.000). Demir eksikliği ve DEA olan grupların bakır düzeyinin istatistiksel karşılaştırılmasında anlamlılık bulunmadı (p=0.77). Ancak en yüksek bakır düzeyi DEA grubunda ölçüldü.

Üç grup arasında COX enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.001). Demir eksikliği anemisi grubunda COX enzim aktivitesi DE ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile p=0.000; p=0.029). Kontrol grubu ve DE olan grup karşılaştırıldığında COX enzim aktiviteleri arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı (p=0.25). COX enzim aktivitesi DEA olan grupta en yüksek değerde izlendi.

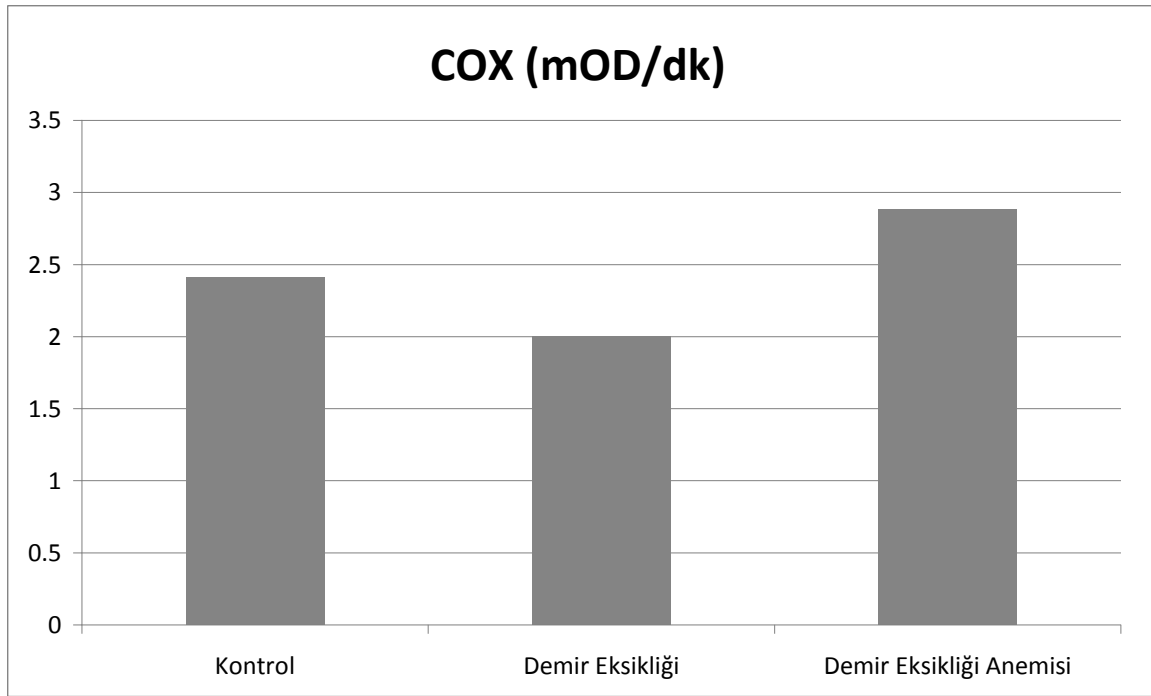
Vakaların serum bakır, CAT ve COX enzim aktiviteleri grafik olarak sırası ile şekil 8, şekil 9, şekil 10’da görülmektedir.



Şekil 8: Grupların bakır düzeyleri



Şekil 9: Grupların katalaz (CAT) enzim aktiviteleri



Şekil 10: Grupların sitokrom c oksidaz (COX) enzim aktiviteleri

Serum bakır, serum demir, serum ferritin, COX ve CAT enzimi arasında DE ve DEA grubunda korelasyon regresyon analizi yapıldı.

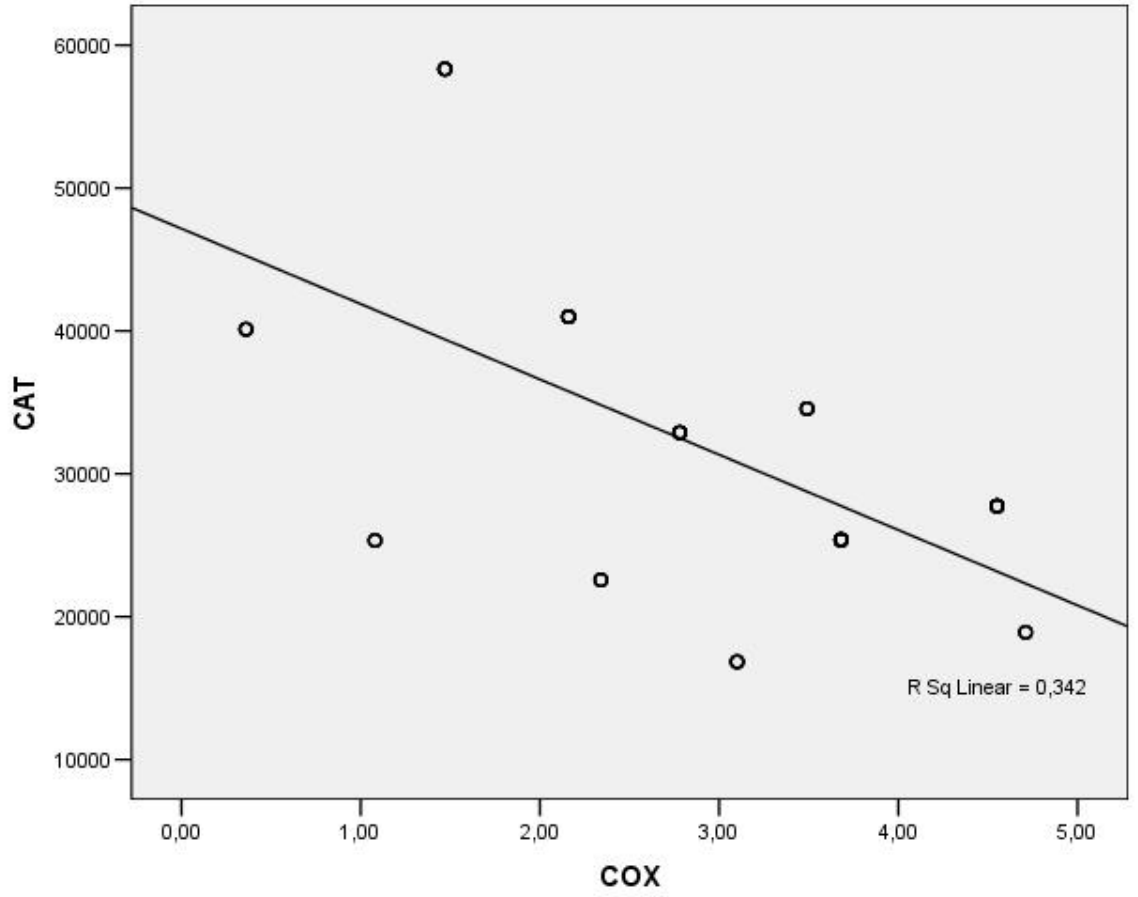
Demir eksikliği grubunda serum bakır ve serum demir arasında $r = -0.12$ ($p=0.3$), serum bakır ve COX arasında $r = -0.22$ ($p=0,08$), serum bakır ve CAT arasında $r = -0.05$ ($p=0.7$), serum demir ve COX arasında $r = 0.01$ ($p=0.9$), serum demir ve CAT arasında $r = -0.24$ ($p=0.05$), serum ferritin ve COX arasında $r = 0.22$ ($p=0.06$), serum ferritin ve CAT arasında $r = -0.02$ ($p=0.8$), serum ferritin ve serum bakır arasında $r = 0.15$ ($p=0.2$), COX ve CAT arasında $r = -0.01$ ($p=0.9$) korelasyon izlendi.

Demir eksikliği anemisi grubunda serum bakır ve serum demir arasında $r = -0.13$ ($p=0.3$), serum bakır ve COX arasında $r = 0.12$ ($p=0.4$), serum bakır ve CAT arasında $r = -0,23$ ($p=0,1$), serum demir ve COX arasında $r = 0.02$ ($p=0.9$), serum demir ve CAT arasında $r = -0.05$ ($p=0.7$), serum ferritin ve COX arasında $r = -0.02$ ($p=0.9$), serum ferritin ve CAT arasında $r = -0.08$ ($p=0.5$), serum ferritin ve serum bakır arasında $r = 0.22$ ($p=0.05$), COX ve CAT arasında $r = -0.49$ ($p=0.00$) korelasyon izlendi (Tablo 6).

Tablo 6: DE ve DEA gruplarında serum demir, serum bakır, serum ferritin, CAT ve COX enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon regresyon analizi sonuçları

Korelasyon Analizleri	DE grubu	DEA grubu
Serum Bakır- Demir	$r = -0.12$ ($p=0.3$)	$r = -0.13$ ($p=0.3$)
Serum Bakır- COX	$r = -0.22$ ($p=0,8$)	$r = 0,12$ ($p=0.4$)
Serum Bakır- CAT	$r = -0.05$ ($p=0.7$)	$r = -0.23$ ($p=0.1$)
Serum Demir-COX	$r = 0.01$ ($p=0.9$)	$r = 0.02$ ($p=0.9$)
Serum Demir-CAT	$r = -0.24$ ($p=0.05$)	$r = -0.05$ ($p=0.7$)
Serum Ferritin-COX	$r = 0.22$ ($p=0.06$)	$r = -0.02$ ($p=0.9$)
Serum Ferritin-CAT	$r = -0.02$ ($p=0.8$)	$r = -0.08$ ($p=0.5$)
Serum Bakır-Ferritin	$r = 0,15$ ($p=0.2$)	$r = 0.22$ ($p=0.05$)
COX- CAT	$r = -0.01$ ($p=0.9$)	$r = -0.49$ ($p=0.00$)

Demir eksikliği anemisi grubunda mitokondriyal COX ve CAT enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon izlendi ($r = -0.49$, $p=0.0$ (Şekil 11).



Şekil 11: Demir eksikliği anemisi olan vakaların mitokondriyal sitokrom c oksidaz (COX) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon regresyon analizi grafiği ($r = -0.49$, $p=0.00$).

5. TARTIŞMA

Demir eksikliği anemisinin tüm dünyada görülen yaygın bir sağlık problemi olmasından dolayı insan metabolizması üzerine etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Özellikle demirin enerji metabolizması üzerine etkisi ile ilgili, hayvanlar ve bitkiler üzerinde daha çok olmak üzere, çalışmalar yapılmıştır. Bizim çalışmamızda da DE ve DEA'si olan vakaların bakır bağımlı olup etkisini demir varlığında gösteren mitokondriyal COX ve yapısında demir bulunan CAT enzim aktivitelerinin etkilenip etkilenmediği incelenmiştir.

Demir eksikliğinde yapısında demir içeren sitokromlar, miyoglobin, CAT ve peroksidaz gibi önemli enzimlerin miktarı azalmaktadır (6). Sitokromlar enerji metabolizmasında görevli olup elektron değişimini sağlarlar. Morfolojik ve biyokimyasal olarak DE olan sıçanlarda yapılan çalışmalarda DE'nin kalp, iskelet kası, karaciğer ve kan hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. Kalp ve iskelet kasının karaciğerden daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Ayrıca sitokrom konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak solunum kontrolünü ve glukoneogenezisi bozduğu tanımlanmıştır (7,55,56).

Klempa ve arkadaşları(56) DE olan ve demir verilen sıçanlarda glukoneogenezisi değerlendirmişler. Karaciğerden izole edilen mitokondride ve sitoplazmada alfa-gliserofosfat, sitokrom c redüktaz ve fosfoenolpiruvatkarboksikinaz aktivitelerinin DE olan sıçanların % 27'de azaldığını göstermişlerdir.

Walter ve arkadaşları (7), DE olan, DE olup tedavi verilen ve demiri normal sıçanlarda karaciğer mitokondrilerinde DNA hasarına bakmışlar ve DE olan ratların mitokondriyal DNA'larında diğer gruplara göre daha fazla hasar olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca karaciğer mitokondri respiratuvar oranında azaldığını izlemişlerdir. Mitokondride hasar olmasının sebebi olarak da dört mekanizma öne sürmüşlerdir. Birincisi; Hem içeriğinin azalmasına bağlı olarak mitokondriyal süperoksit salınımının artması ve bunun sonucunda da mitokondri respiratuvar oranının azaldığını düşünmüşlerdir. Ayrıca

süperoksit miktarının artmasının bir nedeninin de sitokromların azalması olabileceği düşünülmüştür. İkincisi; DE'ne cevap olarak barsaktan bakır emiliminin artması ve karaciğerde bakır birikimi olduğu sıçanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (57,58). Dolayısı ile artan bakır konsantrasyonunun da fenton reaksiyonu sonucu hidroksi radikalleri üreterek lipid ve DNA hasarına yol açtığı düşünülmüştür. Çünkü karaciğerde aşırı bakır birikiminin olduğu Wilson hastalığında mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve mitokondriyal DNA hasarı gösterilmiştir (59). Üçüncüsü; DE durumunda DNA tamirinde önemli olan ribonükleotid redüktaz enziminin de miktarı azalmış olup, DNA hasarının sebeplerinden biri olabileceği düşünülmüştür. Dördüncüsü; DE'ne bağlı olarak antioksidan etkisi de olan ferritin sentezinin azalmasıdır. Diyetle demirin yetersiz alınması durumunda karaciğer IRP1 aktivitesi artar buna bağlı olarak da transferrin reseptör sentezi artar, mitokondriyal akonitaz aktivitesi azalır. Akonitaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak mitokondride elektron akımı yavaşlar. Böylece oksidan maddelerin miktarı azaltılmaya çalışılır. Ancak DE'nin üçüncü haftasında IRP1 aktivitesi artışına bağlı olarak ferritin sentezi belirgin azalır. Transferrin reseptör sentezi artırılarak başlangıçta sitoplazmadaki yüksek demir seviyesi kontrol edilmeye çalışılır. Ancak DE devam ettikçe demir deposu ferritin ve hemosiderinden hücre içine demir girişi olur. Ortamda serbest demirin bulunması oksidan etkinin artmasıyla sonuçlanacaktır. Ayrıca ferritinin ferooksidaz aktivitesi olmasından dolayı Fe^{+2} , Fe^{+3} 'e dönüşecek ve oksidan hasarın daha da artmasına sebep olacaktır (7,60).

Masini ve arkadaşları (54), ciddi DEA olan sıçanlarda sitokrom c + c1 ve b 'nin karaciğer mitokondrisinde azaldığını göstermişlerdir. Ciddi DEA durumunda mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak da karaciğerin enerji metabolizmasında belirgin bozulma olduğunu gözlemlemişlerdir. Demir eksikliği bulunan hayvanlarda yapılan başka bir çalışmada ise sitokrom c konsantrasyonunun çok az oranda baskılandığı izlenmiştir. Ancak demir eksikliğinden ziyade bakır eksikliği olan sıçanlarda karaciğer ve kalpte sitokrom oksidaz aktivitesinin ve bakır içeren sitokrom a+a3 konsantrasyonunun belirgin azaldığı görülmüştür (61). Dallman ve Goodman'ın (9), sıçanlarda yaptığı çalışmada serbest diyetle beslenen kontrol grubundaki sıçanlardaki sitokrom oksidaz aktivitesinin DE olan sıçanların sitokrom oksidaz aktivitesinden farklı olmadığı, ancak bakır eksikliği olan sıçanlarda kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde % 50 azalma olduğu izlenmiştir.

Neonatal sıçan beyinde perinatal DE durumunda COX enzim aktivitesi bakılmış, DE durumunda enzim aktivitesinin beyin her bölgesinde aynı oranda etkilenmediği gözlenmiştir. Yüksek kognitif fonksiyonların olmadığı bölgelerde COX enzim aktivitesinin belirgin azalmadığı izlenirken, hafıza ile ilgili bölgelerde ise belirgin azalma izlenmiştir (8).

Mitokondrial hastalığı olup DE olan çocuklarda enerji metabolizmasını değerlendirmek için mitokondrial solunum zincir (MRC) kompleksine bakılmış, DE olan tüm hastalarda MRC I aktivitesinde azalma izlenirken MRC IV aktivitesinde değişiklik olmadığı görülmüştür (10).

Bizim çalışmamızda ise mitokondriyal solunum zincirinin son basamağında görevli olan COX enzim aktivitesi DEA'li vakalarda artmış izlendi. Demir eksikliği olan grupta COX enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan minimal baskılanmış olarak izlendi. COX enzim aktivitesi en yüksek DEA grubunda saptandı.

Çalışmamızda bakır bağımlı enzim olan COX enzim aktivitesinin artışı, DE ve DEA'ne cevap olarak barsaklardan bakır absorpsiyonunun artmasına da bağlı olabileceğini düşündük. Serum bakır ve COX enzim aktivitesi arasında DEA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber pozitif korelasyon izlendi ($r = 0.12$, $p=0.4$).

Demir eksikliği durumunda enerji metabolizması ile ilgili bitkilerde yapılan çalışmada mitokondrial solunum zinciri komplekslerinden kompleks II'nin daha fazla, kompleks I, III, ve IV'ün daha az etkilendiği görülmüştür. Diğer taraftan demir miktarı ile mitokondriyal enzim aktiviteleri arasında ilişki bulunmaktadır. Çünkü kompleks I en az 20 demir atomu, kompleks II en az 10 demir atomu içermektedir. Bu nedenle aktivitelerinde DE'de sırası ile % 95 ve % 77 azalma izlenirken, kompleks IV sadece 2 demir atomu içerdiği için aktivitesinde % 50 azalma izlenmiştir (62). Bizim çalışmamızda COX enzim aktivitesinde azalma izlemedik. Enzim aktivitesinde azalma olmamasının nedeninin, COX enziminin mitokondriyal solunum zincirinin son basamağı olan kompleks IV'te görevli olması ve bu komplekste diğer komplekslerden daha az demir içeriği olmasına bağlı olabileceğini düşündük.

Demirin kullanılması için bakır gereklidir. Hem yapısında olmayan demirin enterosit içine alınması apikal membran taşıyıcısı DMT1 ile olurken enterosit içine alınmış olan demirin enterositte dolaşıma verilmesi ise bazolateral membran taşıyıcısı ferroportin sayesinde olmaktadır. Ancak ferroportin vasıtası ile dışarı verilen demirin apotransferrine yüklenebilmesi için bakır bağımlı ferooksidaz hefaestin okside Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e

dönüştürmesi gerekmektedir. Birçok hayvan çalışmasında bakır eksikliği olduğunda duodenal enterositlerde yüksek miktarda demir olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hefaestin protein defekti olan farelerde orta dereceli DE olduğu bildirilmiştir (39, 44).

Serum bakır düzeyinin enfeksiyon, enflamasyon, kanama, hamilelik, alım eksikliğine bağlı anemide arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (2,12). Bakır düzeyinin artmasının nedeni olarak da seruloplazmin düzeyinin artışı sorumlu tutulmuştur. Dolayısı ile seruloplazmin ile vücut demir depoları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Karaciğerde depolanmış olan demirin kullanılmak üzere dolaşıma verilebilmesi için seruloplazmine ihtiyaç vardır. Ranganathan ve arkadaşlarının (63), çalışmasında DEA olan sıçanlarda serum bakır, seruloplazmin düzeyi ve ferooksidaz enzim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada seruloplazmin düzeyi ile yüksek serum ve karaciğer bakır düzeyi arasında istatistiksel olarak güçlü korelasyon bulunmuştur. Başka bir çalışmada bazolateral membran bakır ATPaz (ATP7A) gen ekspresyonunun DE olan sıçanlarda arttığı, ayrıca DMT1 ve Dcytb genlerinin DE durumunda sıçanlarda yüksek oranda bulunduğu gözlenmiştir. Bununla beraber 7-12 haftalık DE olan sıçanlarda karaciğer bakır düzeyinin arttığı izlenmiştir. Demir eksikliği durumunda bakır düzeyinin hücre içinde yüksek olmasının nedeninin de enterositte bulunan DMT1'in bakır transportunu artırması ve buna bağlı olarak da ATP7A'nın indüksiyonu olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada ayrıca DE olan sıçanlarda hefaestin gen düzeyi bakılmış, tüm yaş gruplarında artmış izlenmekle beraber, enterosit fırçamsı kenardaki demir düzenleyici proteinlere (DMT1 ve Dcytb) oranla hefaestin geninin daha az arttığı görülmüştür (64). Demir eksikliği durumunda Ctr1'in bakır transportunu artırdığı gen analizi ile gösterilememiştir. Bununla beraber metalloioninler hücre içi bakırı bağlayarak intestinal bakır düzenlenmesinde çok önemlidir, çünkü DE esnasında daha fazla bakır emilimini sağlamaktadırlar (64,65).

Bizim çalışmamızda da DE ve DEA'de serum bakır düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile $p=0.00$; $p=0.00$). Demir eksikliği durumunda serum bakır düzeyinin artmaya başladığı ve DEA grubunda daha yüksek bakır düzeyi izlenmesine rağmen iki grup arasındaki bakır düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark gösterilemedi ($p=0.77$). Bakır düzeylerinin DE ve DEA de artmasının nedeni olarak barsaktan bakır absorpsiyonunun iki değerlikli metallerinde taşıyıcısı olan DMT1 aracılığı ile artmasına bağlı olduğunu düşündük.

Bakır dokularda serbest kaldığında oksidan hasara sebep olan elementlerden biridir. Demir eksikliğinde oksidan hasarın artmasının sebeplerinden birinin de bakırın düzeyinin artması olduğu düşünülmektedir (7). Diğer taraftan yapısında bakır içeren COX enzimi mitokondri için önemli antioksidan enzimlerden biridir. Mitokondride oksidan maddelerin artması durumunda COX enzimi yeterli olmadığı durumda diğer antioksidan sistemler devreye girerek süperoksit iyonu uzaklaştırılmaya çalışılır. Ortamda fazla miktarda bakır olması sonucunda bakırın oksidasyonuna bağlı süperoksit oluşmakta bu da Haber-Weiss reaksiyonunu aktive ederek sonuçta hidrojen peroksit oluşumuna neden olmaktadır. Hidrojen peroksitte doku hasarına sebep olmaktadır (50).

Karimi ve arkadaşları (46), *Astragalus neo-mobayenii* bitkisinde aşırı miktarda bakır bulunduğu durumda antioksidatif enzimler ve lipit peroksidasyonu durumunu değerlendirmişler ve giderek artan konsantrasyonlarda bakır içeriği olan üç grup oluşturmuşlar, sonuçta bakır konsantrasyonu arttıkça demir miktarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca artan bakır konsantrasyonuna paralel olarak SOD, CAT ve peroksidaz enzim aktivitesinin ve lipit peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığını belirlemişlerdir. Dolayısı ile ortamda aşırı bakır bulunması durumunda reaktif oksijen radikalleri özellikle Haber-Weiss reaksiyonu sonucu çok toksik olan hidroksil radikali üretimi olmakta, buna cevap olarak da antioksidan enzimlerin arttığını belirtmişlerdir (46,50).

Çalışmamızda serum bakır ile antioksidan enzim olan CAT arasında hem DE hem de DEA grubunda istatistiksel anlamlı olmayan negatif bir korelasyon izlendi (sırası ile $r = -0.05$, $p=0.7$; $r = -0.23$, $p=0.1$). Hem DE hemde DEA'de ortamda demir düşük olduğu için CAT enziminin yeterli fonksiyon gösteremediğini düşündük.

Demir eksikliği anemisinde demir bağımlı olan CAT enzim aktivitesi ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Yılmaz ve arkadaşları (66), DEA'de antioksidan enzim aktivitelerini değerlendirmek amacı ile 20 hastanın eritrosit SOD ve CAT enzim aktivitelerine ve plazmada da MDA, protein karbonil, total sülfidril grupları konsantrasyonuna bakmışlar, kontrol grubu ile CAT ve SOD enzim aktiviteleri arasında fark bulamamışlar, ancak önemli antioksidan olan total sülfidril gruplarını DEA'de anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Total sülfidril gruplarının düşük bulunmasının sebebinin DEA'de oksidan etkinin artması olarak yorumlamışlardır. Tunç ve arkadaşları (67), 21 DEA'li çocukta oral demir tedavisi verip tedavi öncesi ve sonrası antioksidan enzim aktivitesi ve lipit peroksidasyonunu değerlendirmişler, MDA düzeyinin DEA grubunda

kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ancak tedavi alan grupla kontrol grubu arasında fark izlenmediğini tespit etmişlerdir. Dolayısı ile DEA’de lipit peroksidasyonunun arttığını ve DEA sırasında oluşabilecek oksidatif stresin takibi için MDA seviyesinin bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmüşlerdir.

Kurtoğlu ve arkadaşlarının (5), çalışmasında DEA olan 63 vaka, DEA olup altı hafta demir tedavisi verilen 63 vaka, DEA tedavisi alıp tedavisi sonlandırılan 63 vakada, oksidatif stresin değerlendirilmesi amacı ile MDA, Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeylerine ve SOD, CAT enzim aktivitelerine bakmışlar. Kontrol grubuna göre DEA’de eritrosit CAT ve SOD enzim aktivitelerinin ve GPx düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca DEA’de serum MDA düzeylerinin artmış olduğu yani oksidatif stresinde artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada altı hafta demir tedavisi verilen grupta ise enzim aktivitelerinin arttığı, MDA düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Tedavisi tamamlanan grupla, altı hafta tedavi alan grup arasında enzim aktivitesi ve MDA düzeyi arasında fark görülmemiştir. Sonuçta demir tedavisinin ilave oksidatif stres oluşturmadığını da belirtmişlerdir.

Yoo ve arkadaşları (6), 33 DEA (hemoglobin konsantrasyonu < 12 g/dL ve ferritin konsantrasyonu < 15 ng/ml) olan kadın hastada tedavi öncesi ve 4-6 ay demir tedavisi verildikten sonra kan oksidan, antioksidan ve CAT aktivitesi bakmışlar. Çalışmanın sonucunda DEA’ si olan vakalarda kontrol grubuna göre oksidan aktivitenin yüksek, total antioksidan aktivitenin ve CAT aktivitesinin düşük olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Ayrıca tedavi verilen vakalarında oksidan, antioksidan ve CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre farklılık izlenmemiştir. Ayrıca DEA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber hemoglobin düzeyi, total antioksidan aktivite, CAT aktivitesi ve serum demiri ile oksidan aktivitenin negatif korelasyon gösterdiği bulunmuş (sırası ile $r = 0.22$, $r = -0.14$, $r = -0.23$, $r = -0.20$). Total antioksidan aktivite ile CAT arasında ise pozitif korelasyon bulunmuş ($r = 0.62$, $p < 0.05$). Bizim çalışmamızda hem DE hem de DEA grubunda ferritin ile katalaz arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber benzer şekilde negatif korelasyon izlendi (sırası ile $r = -0.02$, $p = 0.8$; $r = -0.08$, $p = 0.5$).

Çalışmamızda kontrol grubuna göre DE ve DEA grubunda istatistiksel olarak fark gösterilmemesine rağmen sayısal olarak CAT enzim aktivitesinde azalma olduğu izlendi. Yapılan çalışmaların çoğunda CAT enzim aktivitesi eritrositlerde çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda ilk kez CAT enzim aktivitesi mitokondride çalışıldı. Mitokondrilerde CAT miktarının daha düşük olduğu bilinmektedir. Ayrıca DE’de mitokondriyal CAT enzimi

azalmakla beraber eritrositlerde bulunan CAT enzimi kadar etkilenmemiş olabileceğini, bu nedenle istatistiksel olarak anlamlı düşük bulamadığımızı düşündük.

Demir eksikliği grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber COX ve CAT enzim aktiviteleri arasında negatif korelasyon izlendi ($r = -0.01$, $p=0.9$). Demir eksikliği anemisi grubunda ise COX ve CAT enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon izlendi ($r = -0.49$, $p=0.00$).

Çalışmamızda ayrıca serum demir ile CAT aktivitesi arasında DE'de zayıf negatif korelasyon izlendi ($r = -0.24$, $p= 0.05$). Yapılan çalışmalarda DEA'de oksidan hasarın arttığı gösterilmiştir. Dolayısı ile demir bağımlı enzim olan CAT aktivitesinin DE'de artan oksidan maddelere karşı cevap olarak aktivitesini artırmaya çalıştığını bundan dolayı demir ve ferritin ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber negatif korelasyon olduğunu, ancak ortamda yeterli demir olmaması nedeni ile de antioksidan etkisini yeterli gösteremediğini düşündük.

Çalışmamızda mitokondride anemi durumunda COX enzim aktivitesi artarken CAT enzim aktivitesinde azalma olduğu tespit edildi. Dolayısı ile DE'ne bağlı olarak mitokondride CAT enzim aktivitesinin yeterli olmaması sonucunda oksidan aktivite artmaktadır. Diğer taraftan serum bakır yüksekliğine bağlı olarak da reaktif oksijen radikal üretimi artacaktır. Serum bakırın yüksek, serum demirin düşük olması sonucunda mitokondride COX enzim aktivitesinin arttığını, yeterli fonksiyon göremeyen CAT enzim aktivitesinin de azaldığını düşündük.

Çalışmamızda; DEA gelişmeden, DE durumunda da mitokondrial enzimlerde etkilenme olduğu gösterildi. Demir eksikliği durumunda serum bakır seviyesinde artmanın başladığı DEA'de en fazla artışın olduğu tespit edildi. Ortamda artan bakıra bağlı olarak mitokondriyal COX enzim aktivitesinin artmaya, azalan demire bağlı CAT enzim aktivitesinin azalmaya başladığı, DE döneminde oksidan etkilenmenin başladığı, anemi döneminde ise bu etkinin daha da arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, demir eksikliğinin anemi gelişmeden tedavi edilmeye başlanmasının oluşacak olan oksidan hasarın önlenmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Çalışmamızda DE ve DEA'li vakalarda serum bakır düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğunu ($p=0.000$), serum demir ile serum bakır düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif korelasyon olduğunu (sırası ile $r= -0.12$, $p=0.3$; $r= -0.13$, $p=0.3$) saptandı. Demir eksikliği ve DEA gruplarında serum bakır düzeyinin yüksek olmasının demirin yetersiz alınımına yada demir ihtiyacının artmasına bağlı diğer iki değerlikli metallerin de taşıyıcısı olan DMT1 aracılığı ile barsaktan bakır absorpsiyonunun artmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

2. Mitokondriyal COX enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre DE'de azaldığı ve DEA'de arttığı görüldü (sırası ile 2.4, 2.0, 2.9 mOD/dk).

3. Demir eksikliğinde COX aktivitesinin azalması ortamda bakırın oksidan hasar oluşturacak kadar artmamış olması ile açıklanabilir.

4. Demir eksikliği anemisindeki COX enzim aktivitesinin kontrol ve DE gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi (sırası ile $p=0.02$, $p=0.00$). Demir eksikliği anemisindeki COX artışının COX'un bakır bağımlı bir enzim olması dolayısı ile artan bakıra bağlı artmış olduğunu düşündük. Demir eksikliği anemisi vakalarında serum bakır ile COX enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber pozitif korelasyon izlendi ($r=0.12$, $p=0.4$).

5. Katalaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre DE ve DEA vakalarında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber azaldığı saptandı ($p=0.09$). Serum demirinin yeterli olmamasına bağlı olarak yapısında demir bulunan CAT enzim aktivitesinin azaldığı düşünüldü.

6. Demir eksikliği anemisinde mitokondriyal COX enzim aktivitesi artarken mitokondriyal CAT enzim aktivitesinin azaldığını, aralarında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu görüldü ($r= -0.49$, $p=0.00$). Ortamda demirin az bulunması ve bakırın miktarının artmış olmasının sonucu olarak oksidan etkinin DE ve DEA'de arttığı ve

buna bağlı olarak da antioksidan enzimlerden olan COX enzim aktivitesinin artmış olabileceği düşünöldü.

7. Çalışmamızın sonucunda, oksidan hasardan etkilenmenin DE döneminde başladığı ve anemi döneminde en yüksek düzeyde olduğu gösterildi.

Sonuç olarak oksidan hasarı önlemek için demir eksikliğinin tedavisine anemi gelişmeden başlanması gerektiği kanısına varıldı.

7. ÖZET

Demir Eksikliği ve Demir Eksikliği Anemisi Olan Çocuklarda Sitokrom C Oksidaz, Katalaz Enzim Aktivitelerinin ve Bakır Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Amaç: Demir eksikliği (DE) ve demir eksikliği anemisi (DEA) vakalarında mitokondriyal sitokrom c oksidaz (COX) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin etkilenip etkilenmediğini belirlemek.

Yöntem-Gereç: Grup 1(Kontrol): Hemogloblin (Hb) değeri yaşa göre normal, serum ferritin düzeyi 15 ng/ml ve transferin saturasyonu (TS) %15'in üstünde; Grup 2 (DE): Hb değeri normal, ferritin düzeyi 15 ng/ml ve/veya TS %15'in altında; Grup 3 (DEA): Hb değeri düşük, ferritin düzeyi 15 ng/ml ve TS %15'in altında olan, 24 ay-17 yaşları arasında olan ve her grupta 70 vaka olmak üzere toplam 210 vaka çalışmaya alındı. Her vakadan bir kez kan örneği alındı, tüm vakaların serum bakır düzeyleri, lenfositlerin mitokondrilerinde CAT ve COX enzim aktiviteleri çalışıldı.

Bulgular: Gruplar arası bakır düzeyleri, COX ve CAT enzim aktiviteleri karşılaştırıldı. Üç grup arasında CAT enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p=0,09$). Ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasada CAT enzim aktivitesi DEA'li hastalarda daha düşük olarak saptandı. DE ve DEA olan gruplarda bakır düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırası ile $p=0,000$, $p=0,000$). En yüksek bakır düzeyi DEA grubunda ölçüldü. DEA grubunda COX enzim aktivitesi hem DE hemde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırası ile $p=0,000$; $p=0,029$). Demir eksikliği ile kontrol grubunun COX enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,25$). Demir eksikliği anemisinde mitokondriyal COX enzim aktivitesi artarken CAT enzim aktivitesinde azalma olduğu tespit edildi ve her iki enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r = -0,49$, $p=0,00$).

Tartışma: DE ve DEA'ne cevap olarak bakır absorpsiyonunun artmasına bağlı serum bakır düzeyinin ve yapısında bakır bulunan COX enzim aktivitesinin arttığı düşünülmektedir. Ayrıca demir absorpsiyonunun azalmasına bağlı olarak yapısında demir bulunan antioksidan etkili CAT enzim aktivitesinin azaldığı düşünülmüştür. DE ve DEA'de ortamda demirin az bulunması ve bakırın miktarının artmış olmasının sonucu olarak oksidan etkinin arttığını ve buna bağlı olarak da antioksidan enzimlerden olan COX enzim aktivitesinin arttığı düşünülmüştür. Sonuç olarak DEA gelişmeden, DE aşamasında da mitokondriyal enzimlerde etkilenme olduğu gösterilmiştir. Demir eksikliğinin anemi gelişmeden tedavi edilmeye başlanmasının oluşacak olan oksidan hasarın önlenmesi açısından da önemli olduğu kanısına varılmıştır.

8. SUMMARY

Evaluation of the Levels of Cytochrome C Oxidase, Catalase Enzyme Activity and Copper Levels in Children with Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia

Objective: The present study was conducted to evaluate whether the levels of mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) and catalase (CAT) enzyme activity are affected in patients with iron deficiency (ID) and iron deficiency anemia (IDA).

Materials and Methods: A total of 210 cases aged between 24 months and 17 years were included in the study, and each group consisted of 70 cases. Group 1 (Control): Hemoglobin (Hb) level was normal, serum ferritin was 15 ng/ml, and transferrin saturation (TS) was above 15%; Group 2 (ID): Hb level was normal, serum ferritin was 15 ng/ml, and/or TS was below 15%; Group 3 (IDA): Hb level was low, serum ferritin was 15 ng/ml, and TS was below 15%. A single blood sample was collected from each patient, and serum copper levels, CAT and COX enzyme activities in the mitochondria of the lymphocytes were assayed.

Results: Copper levels and the levels of COX and CAT enzyme activities were compared between the groups. No significant difference was observed between the three groups in terms of CAT enzyme activity ($p=0.09$). However, the level of CAT enzyme activity was quantitatively lower in patients with IDA. Copper levels were found to be significantly higher in the ID and IDA groups compared to the control group ($p=0.000$, $p=0.000$, respectively). The highest copper levels were observed in the IDA group. The level of COX enzyme activity in the IDA group was found to be significantly higher compared to the ID and control groups ($p=0.000$ and $p=0.029$, respectively). There was no significant difference between the iron deficiency group and the control group in terms of the level of COX enzyme activity ($p=0.25$). Mitochondrial COX enzyme activity was found to be higher and CAT enzyme activity was lower in patients with iron deficiency anemia, and there was a significant negative correlation between the activity levels of the two enzymes ($r=-0.49$, $p=0.00$).

Discussion: Based on the findings of the present study, serum copper levels and the activity of copper-dependent enzyme COX are elevated due to increased copper absorption in response to ID and IDA. Furthermore, the study revealed decreased activity of the iron-dependent antioxidant enzyme CAT in relation to decreased iron absorption. It is considered that oxidative stress increased due to iron deficiency and elevated copper levels in ID and IDA, and this in turn increased the level of antioxidant COX enzyme activity. In conclusion, this study demonstrated that mitochondrial enzymes were affected by ID, even in the absence of IDA. We suggest that the treatment of iron deficiency prior to anemia development is also important to prevent oxidative damage.

9. KAYNAKLAR

1. Iannotti L L, Tielsch J M, Black M M, Black R E. Iron supplementantation in early childhood: health benefits and risks. *Am J Clin Nutr*, 84:1261-1276, 2006.
2. Arredondo M, Nunez M T. Iron and copper metabolsm. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 313-327, 2005.
3. Wessling-Resnick M. Iron Imports. III. Transfer of iron from the mocosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290:G1-G6, 2006.
- 4.Pannuru P, Vadi DR, Kindinti R R, Varadacharyulu N. Increased erythrocyte antioxidant status protects against smoking induced hemolysis in moderate smokers. *Human Experimental Toxicology*, 000(00)1-7, 2010.
5. Kurtoglu E, Ugur A, Baltacı A K, Undar L. Effect of Iron Supplementation on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Iron-Deficiency Anemia. *Biological Trace Element Research*, 96:117-123, 2003.
6. Yoo J H, Maeng H Y, Sun Y K, Kim Y A, Park D W, Park S T, Lee S T, Choi J R. Oxidative Status in Iron-Deficiency Anemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23: 319–323, 2009.
7. Walter P B, Knutson M D, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, Viteri F E, Ames B N. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *PNAS*, 99 (4): 2264-2269, 2002.
8. de Deungria M, Rao R, Wobken JD, Luciana M, Nelson CA, Georgieff MK: Perinatal iron deficiency decreases cytochrome c oxidase(CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. *Pediatr Res*, 48 (2):169-176, 2000.

9. Dallman PR: Cytochrome oxidase repair during treatment of copper deficiency: Relation to mitochondrial turnover. *J. Clin. Invest*, 46:1819, 1967.
10. Kwon HE, Lee JH, Lee YM, Kang HC, Lee JS, Kim HD: Iron deficiency in children with mitochondrial disease. *Metab Brain Dis*, 25:185-189, 2010.
11. Ferrari M, Mistura L, Patterson E, et al. Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA study. *European journal of Clinical Nutrition*, 19 January 2011. doi: 10.1038/ejcn.2010.279.1-10, 2011.
12. Nathan and Oski's: *Hematology of Infancy and Childhood*, 7th ed., Saunders, Elsevier, Canada, 2009, pp. 521-570.
13. Anak S S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G, Kemahlı S, Öztürk G, Yeşilipek M A: *Pediatric Hematology*, Birinci basım, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2011, s. 214-247.
14. Andrews N C: Iron Homeostosis: Insights from genetic and animal models. *Nat Rev Genet*, 1: 208-217, 2000.
15. Kappas A, Drummond G S, Galbraith R A. Prolonged clinical use of heme oxygenase inhibitor: hematological evidence for an inducible but reversible iron-deficiency state. *Pediatrics*, 91: 537-539, 1993.
16. Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, et al: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388: 482-488, 1997.
17. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P: Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, 93: 4406-4417, 1999.
18. Smitha E A, Newland P, Bestwick K G, Ahmed N. Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia *J Trace Elem Med Biol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.07.002>, 2012.
19. Sezgin ME, Baytan B, Güneş AM: Iron and Iron Metabolism. *Güncel Pediatri*, 10:65-69, 2012.

20. Vulpe C D, Kuo Y M, Murphy T L, et al: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla Mouse. *Nat Genet*, 21: 195-199, 1999.

21. Li L, Vulpe C D, Kaplan J: Functional studies of hephaestin yeast: evidence for multicopper oxidase activity in the endocytic pathway. *Biochem J*, 375: 793-798, 2003.

22. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC: Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell*, 117:285-297, 2004.

23. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T: Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 116:565-576, 2004.

24. Nemeth E, Ganz T: Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*, 26: 323-342, 2006.

25. Naigamwalla DZ, Webb JA, Giger U. Iron deficiency anemia. *Can Vet J*, 53:250–256, 2012.

26. Torti F M, Torti S V: Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99: 3505-3516, 2002.

27. Philip Lanskovsky: *Manuel of Pediatric Hematology and Oncology*, Fourth ed., Academic Pres, Elsewier, USA, 2005, pp. 31-46.

28. Fretham S J B, Carlson E S, and Georgieff M K. The Role of Iron in Learning and Memory *Adv Nutr*, 2: 112–121, 2011.

29. Congdon E L, Westerlund A, Algarin C R, Peirano P D, MD, Gregas M, Lozoff B, and Nelson C A. Iron Deficiency in Infancy is Associated with Altered Neural Correlates of Recognition Memory at 10 Years. *J Pediatr*, 160:1027-33, 2012.

30. Sandström G, Börjesson M, Rödger S: Iron Deficiency in Adolescent Female Athletes-Is Iron Status Affected by Regular Sporting Activity? *Clin J Sport Med*, 0:1–6, 2012.

31. Lutter CK: Iron Deficiency in Young Children in Low-Income Countries and New Approaches for Its Prevention. *J Nutr*, 138:2523-2528, 2008.

32. Teziç T, Gedik Y, Kumandaş S, et al: Trabzon Merkez ve Köylerindeki 12-17 Yaş Grubu Demir Eksikliği Prevelansı. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 33: 209-218, 1990.
33. Dalman PR, Siimes MA: Percentile curves for hemoglobin and red cell volume in infancy and childhood. *J Pediatr*, 94:28, 1979.
34. Bayraktar UD, Bayraktar S. Treatment of iron deficiency anemia associated with gastrointestinal tract diseases. *World J Gastroenterology*, 16(22):2720-2725, 2010.
35. Bortolini GA, Vitolo MR: Relationship between iron deficiency and anemia in children younger than 4 years. *J Pediatr (Rio J)*, 86(6), 2010.
36. White KC: Anemia is a poor predictor of iron deficiency among toddlers in the United States: for heme the bell toll. *Pediatrics*, 115:315-320, 2005.
37. Olivares M, Walter T, Cook JD, et al. Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. *Am J Clin Nutr*, 72:1191-1195, 2000.
38. Collins JF , Klevay LM. Copper. *Adv. Nutr*, 2: 520–522, 2011.
39. Danks DM: Copper deficiency in humans. *Annu Rev Nutr*, 8:235, 1988.
40. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, et al: a mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet*, 9:267-272, 1995.
41. Arredondo M, Muñoz P, Mura CV, Nùñez MT. DMT1, a physiologically relevant apical Cu⁺¹ transporter of intestinal cells. *Am J Physiol*, 284: C1525–C1530, 2003.
42. Markossian K A, Kurganov B I. Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. Function, structure, and mechanism of action. *Biochemistry (Moscow)*, 68: 827–837, 2003.
43. Kodam H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Current Drug Metabolism*, 13:237-250, 2012.

44. Reeves PG, Ralston NVC, Idso JP, Lukaski HC: Contrasting and Cooperative Effects of Copper and Iron Deficiencies in Male Rats Fed Different Concentrations of Manganese and Different Sources of Sulfur Amino Acids in an AIN-93G-Based Diet. *J Nutr*, 134:416-425, 2004.

45. Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*; 552 (2) pp. 335–344, 2003.

46. Karimi P, Khavari-Nejad RA, Niknam V, Ghahremaninejad F, Najafi F: The Effects of Excess Copper on Antioxidative Enzymes, Lipid Peroxidation, Proline, Chlorophyll, and Concentration of Mn, Fe, and Cu in *Astragalus neo-mobayenii*. *The ScientificWorld Journal* Volume 2012, Article ID 615670, 6 pages doi:10.1100/2012/615670, 2012.

47. Lipinski B: Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011doi:10.1155/2011/809696, 2011.

48. Altamura S, Muckenthaler MU: Iron Toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson disease and atherosclerosis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16 (4): 879-895, 2009.

49. Marcelo Genestra: Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19: 1807–1819, 2007.

50. Halliwell B, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219 (1): 1-14, 1984.

51. Gianpiero Vigani: Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *Journal of Plant Physiology*, 169:1– 11, 2012.

52. Strachan T, Read A P: *Human Molecular Genetics*, 2th ed., Wiley-Liss, New York, 1999, chapter 7.

53. Lowry O; Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265 – 275, 1951.

54. McComsey GA, Kang M, Ross AC, et al: Increased mtDNA Levels Without Change in Mitochondrial Enzymes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Infants Born to HIV-Infected Mothers on Antiretroviral Therapy. *HIV Clin Trials*, 9 (2):126-136, 2008.

55. Masini A, Salvioli G, Cremonesi P, Botti B, Gallesi D, Ceccarelli D. Dietary iron deficiency in the rat. I. Abnormalities in energy metabolism of the hepatic tissue *Biochim Biophys Acta*, 1188(1-2):46-52, 1994.
56. Klempa KL, Willis WT, Chengson R, Dallman PR, Brooks GA. Iron deficiency decreases gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *J Appl Physiol*, Nov;67(5):1868-72, 1989.
57. Rodriguez-Matas, M. C., Lisbona, F., Gomez-Ayala, A. E., Lopez-Aliaga, T. & Campos, M. S. Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. *Lab Anim*, 32: 298–306, 1998.
58. Sherman, A. R. & Moran, P. E. Copper metabolism in iron-deficient maternal and neonatal rats. *J Nutr*, 114: 298–306, 1984.
59. Gu, M., Cooper, J. M., Butler, P., Walker, A. P., Mistry, P. K., Dooley, J. S. & Schapira, A. H. dative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet*, 356; 469–474, 2000.
60. Chen, O. S., Schalinske, K. L. & Eisenstein, R. S. Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and the abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr*, 127:238–248, 1997.
61. Dalman P R, Goodman J R: Enlargement of Mitochondrial Compartment in Iron and Copper Deficiency. *Blood*, 35: 496-505, 1970.
62. Vigani G, Zocini G: The fate end the rol of mitochondria im fe-deficient roots of strategy plants. *Plant Signal Behav*, 5:375-379, 2009.
63. Ranganathan PN, Lu Y, Jiang L, Kim C, Collins JF: Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood*, 118:3146-3153, 2011.
64. Collins JF, Franck CA, Kowdley KV and Ghishan FK. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288: G964–G971, 2005.
65. Sharp PA: Ctr1 and its role in body copper homeostozis. *Int J Biochem Cell Biol*, 35:288-291, 2003.

66. Yılmaz K, Kahraman A, Bodur S, Koçar S, Köken T. Reduced Glutathione and antioxidant enyzme activities in erythrocytes of patients with iron-deficiency anemia. T Clin J Med Sci, 24: 2-5, 2004.

67. Tunç B, Özen HG, Delibaş N, Sütçü R. Demir eksikliği anemili çocuklarda oral demir tedavisinin lipit peroksidasyonuna ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi. İnternational Journal of Hematology and Oncology, 11(4): 217-222, 2001.