

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



YENİDOĞAN DÖNEMİNDE SERUM PROHEPSİDİN
DÜZEYLERİNİN TAM KAN SAYIMI, DEMİR
PARAMETRELERİ VE SEPSİS İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. G. BANU ÇELİK

ANKARA 2005

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



YENİDOĞAN DÖNEMİNDE SERUM PROHEPSİDİN
DÜZEYLERİNİN TAM KAN SAYIMI, DEMİR
PARAMETRELERİ VE SEPSİS İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. G. BANU ÇELİK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Berkan GÜRAKAN

ANKARA 2005

*Sağladığı imkanlardan dolayı Başkent Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Mehmet Haberal'a
Pediatri eğitimimde değerli bilgileri ile yetişmemde büyük desteğini gördüğüm Çocuk Sağlığı
ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ümit Saatçi'ye
Bu araştırmamın gerçekleşmesinde ve yönlendirilmesinde önemli pay sahibi olan ve
katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Berkan Gürakan'a
Pediatri eğitimimde ve bu çalışmamda büyük desteğini gördüğüm Prof. Dr. Y. Namık Özbek'e
Tezimin hazırlanmasında fikir desteği ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Aylin
Tarcan'a
Asistanlık eğitimim boyunca sevgilerini ve arkadaşlıklarını paylaştığım tüm asistan
arkadaşlarıma,
Her an yanımda olup desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Emre Ergül'e
Emek, destek ve sevgileri ile hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.*

Dr. G. Banu Çelik

Ankara 2005

ÖZET

Çelik GB, Yenidoğan döneminde prohepsidin düzeylerinin hematolojik, demir parametreleri ve sepsis ile ilişkisi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2005.

Hepsidin demir metabolizmasında anahtar rol oynayan, hepatositlerde üretilen, 25 aminoasitten oluşan, antibakteriyel bir peptiddir. Hepsidin demirin intestinal absorpsiyonunu, makrofajlardan salınımını ve transplental geçişini inhibe eder. Prohepsidin hepsidinin 84 aminoasitten oluşan prekürsörüdür. Yenidoğan döneminde serum prohepsidin düzeyleri bilinmemektedir.

Bu çalışma ile yenidoğan bebeklerde serum prohepsidin düzeylerinin belirlenmesi ve sepsisli yenidoğan bebeklerdeki düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 16 sağlıklı term, 26 sağlıklı prematüre, 6 sepsisli term ve 15 sepsisli prematüre olmak üzere 63 yenidoğan bebek alındı. Bebeklerden bir defa alınan kan örneğinde serum prohepsidin düzeyi, tam kan sayımı, demir parametreleri ve C-reaktif protein bakıldı. Serum prohepsidin düzeyleri sağlıklı term bebeklerde $482\pm371,9$ ng/mL (ortalama: 464,4), sağlıklı prematüre bebeklerde $496,7\pm443,5$ ng/mL (ortalama: 231,3) bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Term bebeklerde ve prematüre sağlıklı grupta prohepsidin düzeyleri ile örnek alınma günü ve doğum ağırlığının ilişkili olmadığı görüldü. Prematüre sağlıklı grupta prohepsidin düzeyleri ile gestasyon haftası arasında ilişki bulunmadı. Term sepsis grubunda prohepsidin düzeylerinin sağlıklı gruba göre önemli oranda yüksek olduğu tespit edildi.

Tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde, prohepsidin düzeyleri ile tam kan sayımı ve demir parametreleri arasında ilişki bulunmadı.

Bu sonuçlar ile sağlıklı term ve prematüre yenidoğan bebeklerde prohepsidin düzeylerinin dağılım aralığının geniş olduğu, sağlıklı erişkin ve süt çocuğu düzeylerine göre daha yüksek

olduğu görülmektedir. Bu durumun postnatal erken dönemde demir ihtiyacının azalmasına bağlı olabileceği dşnld. Bu dönemde görülen prohepsidin ykseklieği, glomerüler filtrasyon hızının fizyolojik düşüklüğüne bağlı da olabilir. Term sağlıklı grubuna göre term sepsis grubundaki anlamlı prohepsidin ykseklieği de hepsidinin bir akut faz reaktanı olmasına ve antibakteriyel etkisine bağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Prohepsidin, Yenidoğan, Sepsis

ABSTRACT

Çelik GB, Pro-hepcidin levels in preterm and term infants: its relationship with complete blood count, iron parameters, and sepsis. Baskent University Faculty of Medicine, department of Pediatrics, Thesis, Ankara, 2005.

Iron is an essential element required for growth and development of all living organisms and maintaining the correct iron balance is crucial. A recently isolated peptide hormone hepcidin is thought to be the principal regulator of iron homeostasis. Hepcidin does its function by limiting intestinal iron absorption and promoting iron retention in reticuloendothelial cells. The human hepcidin gene (19q13) encodes a prepropeptide of 84 amino acids, prohepcidin. This peptide is cleaved to give the 25 amino acid form, predominant form in humans. The levels of this peptide hormone in newborn infants were not determined. The aim of this study was to evaluate pro-hepcidin levels in preterm and term infants and to determine its relationship with sepsis and serum iron, ferritin concentration and transferrin saturation.

Sixteen healthy term, 26 healthy preterm, 6 term septic and 15 septic preterm babies were included in the study. Infants with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial hemorrhage, infection, who received blood transfusions were not included in the study. Complete blood count, serum iron and ferritin concentration, iron binding capacity, transferrin saturation, c-reactive protein and pro-hepcidin levels were studied in blood samples.

Serum pro-hepcidin levels in 16 healthy term and 26 preterm infants were 482 ± 371.9 ng/ml (mean \pm SD) and 496.7 ± 443.5 ng/ml (mean \pm SD) respectively. We found no correlation between pro-hepcidin and serum iron, ferritin levels and transferrin saturations. The difference of pro-hepcidin in term septic infants was significantly higher than healthy babies.

The pro-hepsidin levels of healthy term and preterm newborns in our study is much higher compared to the adult levels and the distrubution width is wide. This result may imply decreased erythropoesis and relatively high iron stores in this period. High levels of prohepcidin in term sepsis group might also imply that it could be used as an acute phase reactant.

Key words: Prohepcidin, Newborn, Sepsis.

KISALTMALAR

CRP	C-reaktif protein
DMT	duodenal metal transporter
EPO	eritropoetin
Fe⁺²	ferröz demir
Fe⁺³	ferrik demir
IL-6	interlökin-6
LEAP	liver-expressed antimicrobial peptide
LPS	lipopolisakkarid
MCV	ortalama eritrosit hacmi
NMR	nükleer magnetik rezonans
RDW	eritrosit dağılım genişliği
RES	retiküloendoteliyal sistem
Tfr 1	transferrin reseptör 1

TABLULAR

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1.	Olguların demografik verileri ve örnekleme günleri.....	13
Tablo 4.2.	Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının hematolojik parametreleri.....	19
Tablo 4.3.	Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının demir parametreleri, CRP ve prohepsidin düzeyleri.....	20
Tablo 4.4.	Preterm sağlıklı ve preterm sepsis gruplarının hematolojik parametreleri.....	21
Tablo 4.5.	Preterm sağlıklı ve preterm sepsis gruplarının biyokimyasal parametreleri.....	22

ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1.	Sağlıklı term grupta prohepsidin düzeylerinin örnekleme günleri ile korelasyonu.....	15
Şekil 4.2.	Sağlıklı term grupta prohepsidin düzeylerinin doğum ağırlıkları ile korelasyonu.....	15
Şekil 4.3.	Sağlıklı prematüre grubunda prohepsidin düzeylerinin gestasyon haftaları ile korelasyonu.....	16
Şekil 4.4.	Sağlıklı prematüre grubunda prohepsidin düzeylerinin doğum ağırlıkları ile korelasyonu.....	17
Şekil 4.5.	Sağlıklı prematüre grubunda prohepsidin düzeylerinin örnekleme günleri ile korelasyonu.....	17
Şekil 4.6.	Prohepsidin düzeylerinin sağlıklı term ve sepsisli term grupları arasındaki farkı.....	23
Şekil 4.7.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ve lökosit sayıları arasındaki korelasyon.....	24
Şekil 4.8.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ve trombosit sayıları arasındaki korelasyon.....	24
Şekil 4.9.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile CRP düzeyleri arasındaki korelasyon.....	25
Şekil 4.10.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile demir düzeyleri arasındaki korelasyon.....	26

Şekil 4.11.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile ferritin düzeyleri arasındaki korelasyon.....	27
Şekil 4.12.	Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile transferrin saturasyonları arasındaki korelasyon.....	28

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
3. Gereç ve Yöntem.....	9
4. Bulgular.....	12
5. Tartışma.....	28
6. Sonuçlar.....	33
7. Kaynaklar.....	34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepsidin; karaciğerde sentezlenen, 25 aminoasitten oluşan, 2-3 kDa molekül ağırlıklı, katyonik, antibakteriyel ve antifungal aktivitesi bulunan, demir metabolizmasının regülasyonunda anahtar rol oynayan bir peptiddir (1). Başlangıçta idrarda bulunan bu madde, daha sonra plazma ultrafiltratında da izole edilmiştir (2). Hepsidinin predominant formu insan idrarında bulunan 25 aminoasit yapısındaki hepsidin-25 olup, daha az bulunan diğer iki formu da hepsidin-22 ve hepsidin-20'dir. Öncül madde olan 84 aminoasit yapıdaki pre-prohepsidinin N-terminalinden ayrılma sonucunda hepsidin oluşmaktadır (3). Hepsidinin demir regülasyonu yapan bir hormon olduğu, işlevini intestinal demir absorpsiyonu, makrofajların demir deposu ve plasentadan materno-fötal demir transportu üzerinden yerine getirdiği belirtilmektedir (4). Hepsidinin sentetik formları nükleer magnetik rezonans (NMR) spektrometri ile analiz edildiğinde, molekülün sisteinden zengin, küçük, disülfid köprüleri olan saç tokası gibi U şeklinde kıvrılan bir yapısı olması ile doğal bağışıklık sistemine ait bir molekül olan defensine benzediği bilinmektedir (5). Hepsidin antimikrobiyal etkisini mikroorganizma membranında harabiyet yaparak ve inflamasyonda serum demirini düşürüp, mikroorganizmalara uygunsuz bir çevre oluşturarak gösterir.

İnsanda herediter hemakromatoziste, kronik böbrek yetmezliğinde, renal anemide, lipopolisakkarid ve interlökin-6 enjeksiyonu ile oluşturulan enfeksiyon modellerinde, hepatik adenom varlığında prohepsidin düzeyleri ölçülmüş olmasına karşın yenidoğan döneminde prohepsidin düzeyleri bilinmemektedir. Bu çalışmada hepsidinin, hem düzeylerinin saptanması, hem de tam kan sayımı ve demir metabolizması ile ilişkisi yanında sepsisli bebeklerdeki değişimin anlaşılması için yenidoğan döneminde sağlıklı ve sepsisli gruplarda öncül molekülü olan prohepsidin düzeyleri ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEPİDİN

2.1.1. Hepsidin Tanımı ve Yapısı

Hepsidin; 25 aminoasitten oluşan, 2-3 kDa molekül ağırlıklı, katyonik, antibakteriyel ve antifungal aktivitesi bulunan, demir metabolizmasının regülasyonunda anahtar rol oynayan bir peptiddir (1). İn vitro antimikrobiyal özelliği ve karaciğerde sentezlenmesi nedeni ile bu madde; hep: hepatik ve -cidin: antimikrobiyal sözcüklerinden türetilerek hepsidin olarak tanımlanmıştır (1). Başlangıçta idrarda bulunan bu madde, daha sonra plazma ultrafiltratında da izole edilmiş ve liver-expressed antimikrobiyal peptid (LEAP) olarak isimlendirilmiştir (2).

Hepsidin geni 19. kromozomun uzun kolunda 13. lokusta izole edilmiştir (3). İnsanlarda yalnızca tek kopya gen bulunmakta iken, farelerde 7. kromozomda 2 duplike gen mevcuttur (1).

Hepsidin'in predominant formu insan idrarında bulunan 25 aminoasit yapısındaki hepc-25 olup, daha az bulunan diğer iki formu da hepc-22 ve hepc-20'dir. Öncül madde olan 84 aminoasit yapısındaki pre-prohepsidin'in N-terminalinden ayrılma sonucunda hepsidin oluşmaktadır (3).

Hepsidin'in sentetik formları nükleer magnetik rezonans (NMR) spektrometri ile analiz edildiğinde, molekülün sisteinden zengin, küçük, disülfid köprüleri olan saç tokası gibi U şeklinde kıvrılan bir yapısı olduğu saptanmıştır. Ayrıca 6. ve 8. sistein bölgeleri arasında amfipatik yapı oluşumunu sağlayan zincir içi bir bağ olduğu saptanmıştır. NMR diffüzyon çalışmalarında hepsidin-20 solüsyon içinde monomer olarak bulunurken, hepsidin-25 agregasyonu olmuştur. Bu da her iki peptidin farklı aktiviteleri olabileceğini düşündürmektedir (5).

Defensin katyonik, disülfid köprülerinden zengin, 4 kDa molekül ağırlığında, epitelden salınan, antimikrobiyal bir peptiddir. Hepsidin ve defensin birbirine benzemektedir (1, 6). Antifungal (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) ve antibakteriyel (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus grup B*) aktivitesi olduğu bilinmektedir (1, 6).

Hepsidin ekspresyonunun önemli kısmı karaciğerde olmak üzere, daha az miktarda kalp kası, iskelet kası, beyin, akciğerler, testis, mide ve pankreasda da eksprese olduğu gösterilmiştir (1, 7).

2.1.2. Demir Metabolizması

Yenidoğan bebeklerde total vücut demir miktarı yaklaşık 250 mg'dır (8). Çocuklarda total vücut demiri 35-45 mg/kg olmaktadır. Günlük demir kaybı ise 0.5 mg'dır. Yenidoğan bebeklerin ana besin kaynağı anne sütüdür. Anne sütü ve inek sütü ise her 1000 kaloride 0.5-1.5 mg demir içermektedir. Anne sütündeki demirin yaklaşık yarısı absorbe olurken, inek sütündeki demirin ancak %10'u absorbe edilebilmektedir. Normal bir yenidoğanın günlük demir ihtiyacı diyetteki demirin %10'unun emildiği kabul edilirse 1-15 mg/kg/gün arasında değişmektedir. Düşük doğum ağırlıklı, başlangıç hemogloblin düzeyi düşük bulunan ya da anlamlı kan kaybı olan bebeklerde diyetle alınması gereken demir miktarı minimum 2 mg/kg/gün, maksimum 15 mg/kg/gün olmaktadır (9).

Hem demirinin 1/3'i inorganik demirdir. Diyetteki hem demirinin emilimiyle ilişkili mekanizma henüz tanımlanmamıştır. İnorganik demir ferrik (Fe^{+3}) halinden ferröz (Fe^{+2}) haline indirgendikten sonra intestinal epitel hücrelerinde apikal transporter duodenal metal transporter (DMT 1) yolu ile absorbe edilir. Demir enterosite girdikten sonra ya ferritin olarak depolanır, ya da bazolateral membrana geçer. Bazolateral membrandan plazmaya verilmesi; bazolateral transporter protein Ireg 1/ferroportin tarafından gerçekleşmektedir. Kanda ferröz

(Fe⁺²) demir ferrik (Fe⁺³) demire okside olmakta, bu oksidasyonu hephaestin sağlamaktadır. Transferrin dolaşımında 2 adet ferrik demir taşımaktadır (3).

Demirin esas deposu karaciğerdir. “Transferrin+Fe⁺³” kompleksi, transferrin reseptörü (Tfr 1) yoluyla hücrelere girer. Transferrine bağlı olmayan demirin hücreye alınma mekanizması henüz tanımlanmamıştır. Kemik iliğinde eritroid prekürsörlere demir Tfr 1 ile alınmaktadır. Yaşlı eritrositlerin makrofajlarca fagositozu sonrası hem demirin yeniden açığa çıkmasıyla retiküloendoteliyal sistem (RES) re-siklusu oluşmaktadır. RES makrofajlarında demir ferritine bağlı halde dört ferrik (Fe⁺³) demir halinde depolanmaktadır. Makrofajlardan demir salınımı ise Ireg1/ferroportin ile olmaktadır. Dolaşımında tekrar transferrin ile bağlı halde bulunmaktadır (3).

2.1.3. Demir Absorbsiyonunun Regülasyonu

Demir absorpsiyonu 3 şekilde düzenlenmektedir.

- 1. Diyet Regülasyonu:** Diyet ile bolus halinde demir alınımından birkaç gün sonra absorbtif enterositlerde mukozal blok oluşmaktadır (10).
- 2. Depo Regülasyonu:** Total vücut demiri ve demir ihtiyacına göre demir absorpsiyonunun kontrol mekanizması gerçekleşmektedir. Demir eksikliği durumunda depo regülatörü demir emilimini 2-3 kat artırmaktadır (3).
- 3. Eritroid Regülatör:** Demir emilimi eritropoez ihtiyacına göre de değişmektedir. Vücuttaki demir miktarından bağımsız bir regülatördür. İneffektif eritropoezin gerçekleştiği anemilerdeki (talasemi, kongenital diseritropoetik ve sideroblastik anemiler) artmış demir absorpsiyonuna benzemektedir. Bu durumda demir düzeyi

normal olsa bile demir absorpsiyonu artmaktadır. Akut hipokside de demir absorpsiyonu artmaktadır (3).

Eritroid ve depo regülatörleri plazmada dolaşan soluble faktörlerdir. Hepsidin de plazmada dolaşan regülatör bir molekül olduğu anlaşılmıştır (3).

Pigeon ve ark. hepsidin demir metabolizmasında spesifik rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (7). Demir yüklenmesi olan fareler ile kontrol grubundaki farelerin karaciğerlerinden izole ettikleri 225 bazlı c-DNA'dan kodlanan 83 aminoasitli bir proteinin hepsidin C-terminali ile homolog olduğunu göstermişler ve Northern blot analizi ile demir yüklenmesi olan farelerin karaciğerlerinde hepsidin mRNA'sının fazla miktarda ekspresse olduğunu da saptamışlardır (7). Nemeth ve ark. buna zıt olarak hepatositlerin demirle yüklenmesi sonucunda hepsidin mRNA'sının %50 azaldığını bulmuşlardır (11).

Nicolas ve ark. upstream stimulator faktör 2 (Usf 2) -/- farelerde progressif olarak hemakromatozis benzeri fenotip oluştuğunu bildirmişlerdir. Demirin parankimal hücrelerde özellikle karaciğer ve pankreasda ve RES hücrelerinde biriktiğini ve dolaşımında demirin ve transferrin saturasyonunun artmış olduğunu tespit etmişlerdir (12).

Usf 2 -/- farelerde hepc 1 ve hepc 2'nin sessiz olduğu Northern blot ve reverse transkriptaz polimeraz chain reaksiyonu ile saptanmıştır. Hemakromatozis fenotipinin nedeninin ise Usf 2 eksikliğinden çok hepsidin eksikliğine bağlı olduğu belirtilmiştir (12, 13). Bu bulgular ışığında, Usf 2'si yok edilmiş hepsidinden yoksun farelerde, hemakromatozis geliştiği, artmış ekspresyon durumunda ise demir eksikliği ile karşılaştığı ileri sürülmüştür. Bu çalışma, hepsidin demir regülasyonu yapan bir hormon olduğunu, işlevini intestinal demir absorpsiyonu, makrofajların demir deposu ve plasentadan materno-fötal demir transportu üzerinden yerine getirdiği belirtilmektedir (4).

2.1.4. Hepsidin ve Demir Absorbsiyonu

Farelerde demirden yoksun ve demirden zengin diyetle göre hepatik ve duodenal gen ekspresyonlarını inceleyerek, hepsidin intestinal demir emilimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, demirden yoksun diyetle beslenen farelerin, duodenal sitokrom b (Dcytb), divalent metal transporter (DMT 1) ve Ireg1/ferroportin ekspresyonlarının altıncı günde artarak demir absorpsiyonunun 2,7 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin, hepatik hepsidin ekspresyonu ve transferrin saturasyonunun azalması ile korele olduğu görülmüştür. Demir deposu ya da hematolojik parametrelerde değişiklik tespit edilmemiştir. Hepsidin duodenal demir transporter genlerine negatif regülatör sinyal ilettiği düşünülmektedir. Bazı duodenal demir transporterları (DMT1 ve Ireg1) demire yanıtı elementlere (IRE) sahip olup, hücrel demir konsantrasyonlarına göre ekspresyonları değişmektedir (14).

2.1.5. Hepsidin ve İnflamasyon

Lipopolisakkarid (LPS) verilen farelerin karaciğerinde, hepsidin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (7). İntraperitoneal *Micrococcus luteus* ve *Escherichia coli* enjeksiyonundan sonra levrek larvasından hibrid olmuş örneklerden hepsidin izole edilmiştir (7). Beyaz levrek karaciğerinde, balıklar için patojen olan *Streptococcus iniae* ile maruziyet sonrası hepsidin gen ekspresyonunun 4500 kat arttığı, diğer dokularda ise hepsidin ekspresyon seviyelerinin düşük kaldığı görülmüştür (11).

Farelere tek turpentin enjeksiyonu sonrası karaciğer hepsidin mRNA seviyesinde altı kat artış ve serum demir seviyesinde iki kat düşüş tespit edilmiştir. Usf 2'si yok edilmiş, hepsidinden yoksun farelerde, turpentinin hiposideremik etkisinin tamamen köreldiği görülmüştür (14).

İnsanda inflamasyonda hepsidinin rolü ilk defa kronik enfeksiyonlar ya da ciddi inflamatuvar hastalığı bulunanlarda üriner hepsidin ölçülmesi ve 100 kat arttığı görülmüştür. Sık transfüzyon yapılan orak hücreli anemili hastalarda ya da myelofibrozu hastalarda benzer düzeylerde artış tespit edilmiştir. Hepsidin ekspresyonu serum ferritin düzeyi ile korele bulunmuştur. Aynı araştırmacılar, direk LPS verildikten sonra hepatositlerde ya da monositlerden salınan maddeler ile sırası ile hepsidin ekspresyonunun iki ve yirmi beş kat artığı saptanmıştır. Hepsidin ekspresyonunun interlökin-6 (IL-6) ile inkübasyon sonrası arttığı fakat interlökin-1a (IL-1a) ya da tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ile artmadığı gösterilmekte, hepsidinin tip II akut faz reaktanı olduğu düşünülmektedir (11).

2.1.6. Hepsidin ve Anemi/Hipoksi

Demir metabolizması ve inflamasyonun yanında anemi ve hipoksida de hepsidinin rolü olduğu görülmüştür. Flebotomiler yolu ile ya da fenilhidralazin ile oluşturulan akut hemoliz sonucunda geliştirilen akut anemide, artan demir absorpsiyonu ve makrofajlardan demir salınımı sonucu hepsidin ekspresyonunun belirgin şekilde baskılandığı gösterilmiştir. Hemolize bağlı aneminin hepsidin ekspresyonu üzerine olan etkileri aşırı demir yüklenmiş farelerde de aynı şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu da anemi/hipoksiye bağlı hepsidinin azalmasına demir yüklenmesinin olumsuz etki etmediğini düşündürmüştür (15).

Demir eksikliği olan farelerde hepatik hepsidin mRNA'sının azaldığı gösterilmiştir. Farelerde sistemik demir yüklenmesi sonucu demir absorpsiyonunun azaldığı fakat hepsidin ekspresyonunun halen düşük seyrettiği gösterilmiştir. Bu da hepsidin gen ekspresyonunun demir depolarından bağımsız olarak anemi tarafından regüle olduğunu düşündürmektedir (16).

Eritropoetin (EPO) verilen farelerde eritropoezde artış yanında, hepsidinin azaldığı da gösterilmiştir. Bu gözlem, anemi/hipoksinin hepsidin ekspresyonu üzerindeki etkisinin EPO

üzerinden olduğunu gösteren indirekt bir kanıt olmaktadır. Araştırmacılar ayrıca kronik hastalık anemisindeki EPO tedavisinin hepsidin sentezini azaltarak demirin kullanılabilirliğini artırdığını ileri sürmektedirler (17).

Hipoksinin hepsidin üzerine etkilerini in vivo ve in vitro olarak araştıran çalışmalarda insan HepG2 ve Hep3B hücrelerinin hipoksik ortamdaki kültürlerinde hepsidin gen ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Fareler hipobarik hipoksi ortamına yerleştirildiklerinde hepsidin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (15).

2.1.7. Hepsidin ve Kronik Hastalık Anemisi

Enfeksiyonun inflamasyon uyarısından sonra hepsidinin arttığı, bunun da anemiye tetiklediğini gösterilmiştir. Bu da hepsidinin kronik hastalık anemisinin patogenezinde merkezi bir role sahip olduğuna işaret etmektedir (3). Heming ve Sly enfeksiyon ve inflamasyon sırasında hepsidinin artmasına bağlı anemi geliştiğini ilk gösterenlerdir (18).

Weinstein ve ark. ilk in vivo kanıtı ortaya koyan araştırmacıdır. Bu araştırmacılar tarafından tip Ia glukojen depo hastalığı ve anemisi olan bir hastada büyük hepatik adenomların yüksek düzeyde hepsidin ürettiğini göstermekte ve adenom alındıktan sonra demire refrakter aneminin düzeldiği bildirilmiştir (16).

Bu bulgular göz önüne alındığında, romatoid artrit ya da Hodgkin hastalığı/non-Hodgkin lenfoma gibi malignitelerle birlikte inflamasyon sonucu gelişen anemide anahtar mediyatörün hepsidin olabileceği söylenebilmektedir (3).

İnsanda herediter hemakromatozide, kronik böbrek yetmezliğinde, renal anemide, lipopolisakkarid ve interlökin-6 enjeksiyonu ile, hepatik adenom varlığında prohepsidin düzeyleri ölçülmüş olmasına karşın yenidoğan döneminde prohepsidin düzeyleri bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular ve çalışma planı:

Bu çalışma prospektif ve kontrollü bir çalışma olarak düzenlendi. Çalışma Başkent Üniversitesi etik kurulu tarafından onaylandı ve çalışmaya alınan bebeklerin ebeveynlerine bilgilendirilmiş onam imzalatıldı.

Bu çalışmaya Temmuz 2004-Haziran 2005 tarihleri arasında doğmuş, sağlıklı term-prematüre ve sepsisli term-prematüre yenidoğanlar alındı.

Konjenital anomalisi, perinatal hipoksisi, intrakraniyal kanaması, hemolizi, gestasyon yaşına göre düşük doğum ağırlığı olan ve kan transfüzyonu alan bebekler çalışma grubunun dışında bırakıldı.

3.3. Sağlıklı grup:

Çalışma kriterlerine uygun sağlıklı term ve sağlıklı prematüre bebeklerden tarama testleri için kan alınırken tam kan sayımı, serum demir, serum demir bağlama kapasitesi, ferritin, C-reaktif protein ve serum prohepsidin düzeyi için kan alındı.

3.2. Sepsis grubu:

Klinik ve laboratuvar verilere göre sepsis tanısı konulan yenidoğan bebeklerin çalışma için örnekleri tanısal tetkikler alınırken eş zamanlı alındı.

3.4. Örnekler:

Tam kan sayımı için 0.5-1 cc venöz kan EDTA'lı tüpe alınarak 30 dakika içerisinde çalıştırıldı. Serum prohepsidin, serum demiri, serum demir bağlama kapasitesi, ferritin ve C-reaktif protein çalışılması için 2 cc venöz kan biyokimya tüpüne alındı. Bu örnekler 2000

devirde, +4°C'de, 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar çalışılncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.5. Hematolojik ve biyokimyasal ölçümler:

Alınan venöz kan örneklerinde hemoglobin, lökosit, trombosit, ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit dağılım genişliği (RDW), C-reaktif protein (CRP), serum demiri, serum demir bağlama kapasitesi, ferritin ve prohepsidin düzeyleri çalışıldı.

Hemoglobin, lökosit, trombosit, MCV ve RDW düzeyleri hemositometre (Cell-Dyn 3700, Abbott) ile ölçüldü. CRP düzeylerine nefelometrik yöntem (Nefelometre BN 100, Boehringer) ile bakıldı. Serum demiri ve serum demir bağlama kapasitesi spektrofotometrik yöntem (Modular, Roche) ile çalışıldı. Ferritin elektrokemiluminesens sistemi (E-170, Roche) ile ölçüldü.

Prohepsidin, hepsidinin 84 aminoasitlik prekürsörüdür. Prohepsidinin N terminaline karşı üretilmiş tavşan antihepsidin antikorları ile enzim immünoassay yöntemi ile çalışılmaktadır. Bu peptid enzim immünoassay yöntemi ile DRG hepsidin prohormone ELISA (EIA-4015) kitinde çalışılmıştır.

3.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz ve grafikler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows sürüm 11.0 ile gerçekleştirildi. Bebeklerin doğum ağırlığı, gestasyon yaşı, doğum şekli, cinsiyetleri, kan örnekleme günü, hemoglobin, lökosit sayısı, trombosit sayısı, MCV, RDW, CRP, serum demiri, serum demir bağlama kapasitesi, ferritin, prohepsidin değerleri parametrik veri varsayımlarını karşılıyordu. Gruplarda karşılaştırmalar Student T-testi ile yapıldı. Sağlıklı term ve prematüre bebeklerde prohepsidin düzeyleri, doğum ağırlığı, gestasyon haftası ve örnekleme günlerinin ilişkisine Pearson doğrusal korelasyon analizi ile

bakıldı. Prematüre sepsis ve prematüre sağlıklı bebeklerde prohepsidin düzeylerinin örnekleme günleri farklı olduğu için analiz yapılamadı. Term sepsis ve sağlıklı grupta prohepsidin düzeyleri Student T-testi ile karşılaştırıldı. Term bebeklerin prohepsidin ve sepsis parametreleri ilişkisi Pearson doğrusal korelasyon analizi ile araştırıldı. Preterm bebeklerde prohepsidin ile sepsis parametreleri ilişkisi yaş faktörü kontrol edilerek parsiyel korelasyon analizi ile yapıldı. Hasta gruplarında prohepsidin düzeyleri ile demir ve hematolojik parametrelerinin ilişkisi Pearson doğrusal korelasyon analizi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Olgu bilgileri

Çalışmaya toplam 63 yenidoğan bebek alındı. Bebeklerin 32'si erkek, 31'i kız idi. Bunların 16'sı term sağlıklı, 26'sı prematüre sağlıklı, 6'sı term sepsis ve 15'i prematüre sepsis grubunda idiler. Çalışmaya alınan bebeklerin demografik özellikleri tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Olguların demografik verileri ve örnekleme günleri*

Çalışma grubu	Term-sağlıklı (Sayı = 16)	Term-sepsis (Sayı =6)	Preterm-sağlıklı (Sayı =26)	Preterm-sepsis (Sayı =15)
Gestasyon yaşı (hafta)	38.8±0.8 (39) 38-40	38.6±0.8 (38.5) 38-40	31.7±2.8 (31.5) 26-36	30.5±3.2 (30) 26-36
Doğum ağırlığı (gram)	3371±250 (3335) 3000-3800	3518±420.8 (3520) 3040-4100	1727±574 (1760) 700-2920	1448±551.8 (1390) 700-2660
Cinsiyet (erkek/kız)	10/6	5/1	8/18	9/6
Doğum şekli (C/S/normal)	8/8	3/3	23/3	11/4
Örnekleme günleri	8.7±1.9 (8.5) 4-12	8.3±4.6 (6.5) 4-16	3.2±2.8 (3) 1-16	15.2±7.2 (14) 4-27

*Tüm değerler ortalama±standart deviasyon (ortanca)

minimum-maksimum olarak verilmiştir

Term sağlıklı grubu ve term sepsis grubunun gestasyon yaşı, doğum ağırlığı, doğum şekilleri ve örnekleme günleri benzer idi. Prematüre sağlıklı grubu ve prematüre sepsis grubunun gestasyon yaşı, doğum ağırlığı ve doğum şekilleri benzer iken örnekleme günleri arasındaki fark önemli idi.

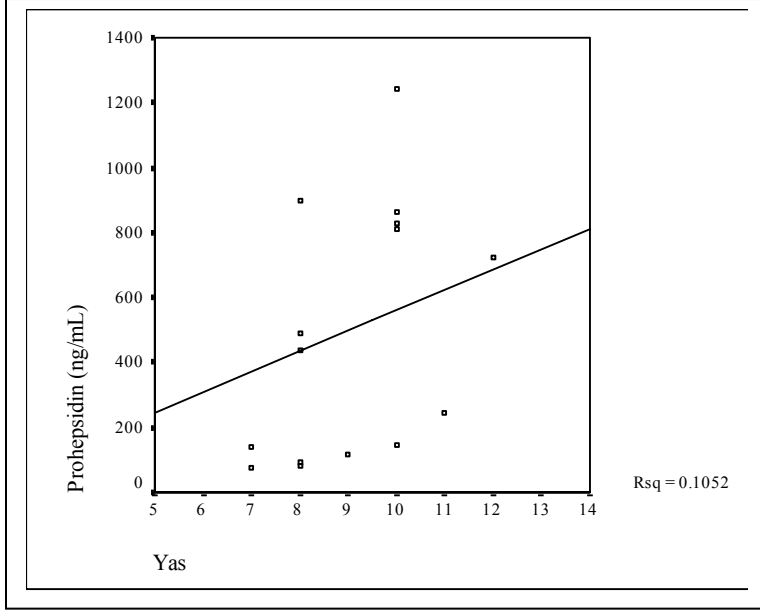
Metodda tanımlanan kriterlere uygun olarak sepsis grubuna alınan hastaların kan kültürü sonuçları; 6 term sepsisli bebekten 4'ünde, 15 prematüre sepsisli bebekten 13'ünde üreme tespit edildi. Term sepsis grubunun kan kültürlerinin 1'inde *Klebsiella pneumoniae*, 3'ünde *Staphylococcus epidermidis* üredi. Prematüre sepsis grubunun kan kültürlerinin 1'inde *Candida albicans*, 2'sinde *Klebsiella pneumoniae*, 3'ünde *Staphylococcus epidermidis*, 3'ünde *Pseudomonas aeruginosa*, 2'sinde *Serratia marcescens*, 2'sinde *Staphylococcus aureus* üredi.

4.2. Hematolojik, biyokimyasal parametreler ve prohepsidin sonuçları

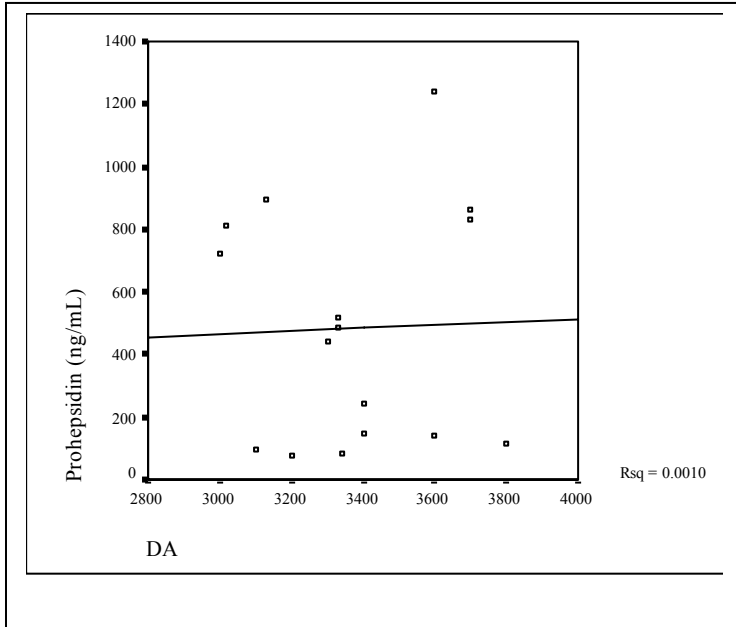
4.2.1. Sağlıklı bebeklerde prohepsidin düzeyleri:

Sağlıklı term bebeklerde prohepsidin düzeyleri 482 ± 371.9 ng/mL (ortalama: 464.4) ölçüldü. Sağlıklı prematüre bebeklerde prohepsidin düzeyleri 496.7 ± 443.5 ng/mL (ortalama: 231.3) ölçüldü. Sağlıklı preterm ve sağlıklı term gruplarının serum prohepsidin düzeyleri arasında önemli fark bulunmadı. Bu iki grubun örnekleme zamanları farklı idi.

Term bebeklerde örnek alınma gününe ve doğum ağırlığına göre prohepsidin düzeylerinin ilişkisi olmadığı görüldü (rsq: 0.1052, 0.0010) (Şekil 4.1-4.2.).

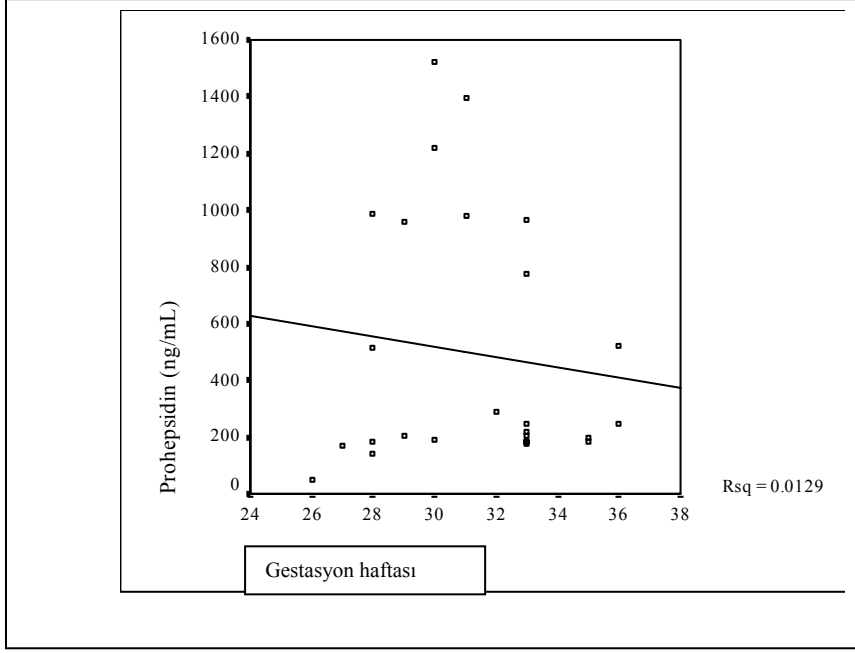


Şekil 4.1. Sağlıklı term grupta prohepsidin düzeylerinin örnekleme günleri ile korelasyonu

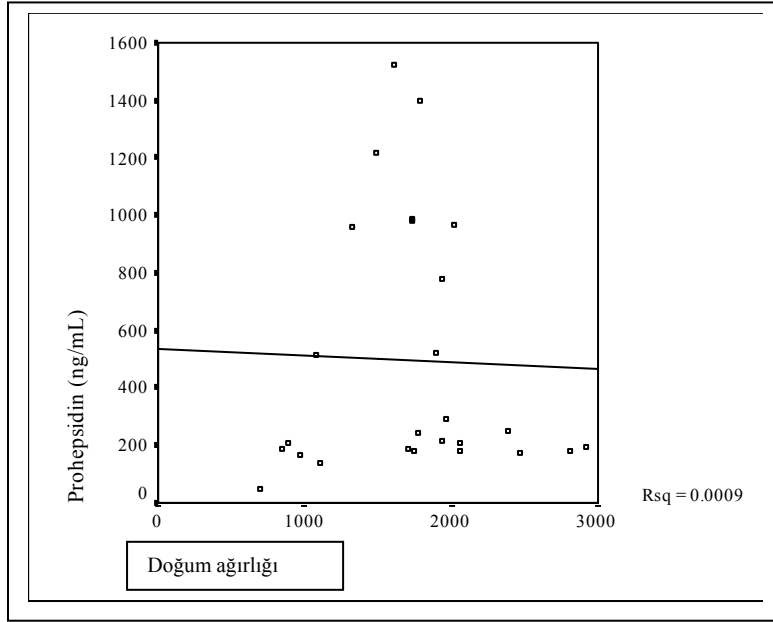


Şekil 4.2. Sağlıklı term grupta prohepsidin düzeylerinin doğum ağırlıkları ile korelasyonu

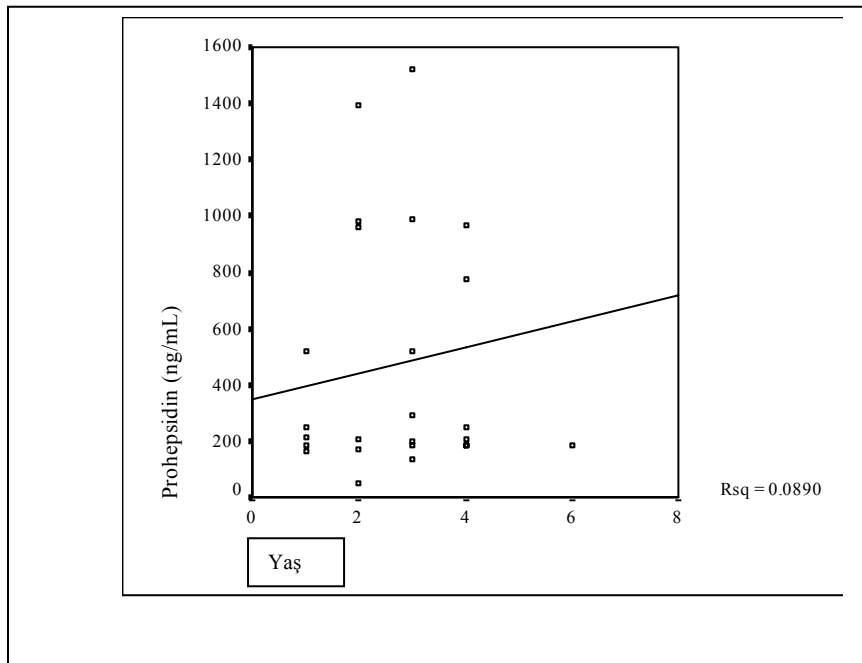
Preterm sağlıklı grupta prohepsidin d¼zeylerinin gebelik haftası, doğum ağırlığı ve ¼rnek alınma g¼n¼ ile ilişkili olmadığı g¼r¼ld¼ (rsq: 0.0129, 0.0009, 0.0890) (şekil 4.3.-4.4.-4.5.).



şekil 4.3. Sağlıklı premat¼re grubunda prohepsidin d¼zeylerinin gestasyon haftaları ile korelasyonu



Şekil 4.4. Sağlıklı prematüre grubunda prohepsidin düzeylerinin doğum ağırlıkları ile korelasyonu



Şekil 4.5. Sağlıklı prematüre grubunda prohepsidin düzeylerinin örnekleme günü ile korelasyonu

4.2.2. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri, tam kan sayımı ve demir parametrelerinin karşılaştırılması:

Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının tam kan sayımları tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının prohepsidin düzeyleri, demir parametreleri ve CRP düzeyleri tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Prematüre sağlıklı ve prematüre sepsis gruplarının tam kan sayımları tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Prematüre sağlıklı ve prematüre sepsis gruplarının prohepsidin düzeyleri, demir parametreleri ve CRP düzeyleri tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

Term sağlıklı ve term sepsis grupları arasında demir parametreleri açısından fark bulunmadı. Term sağlıklı ve term sepsis grupları arasında prohepsidin düzeyinin ortalamaları karşılaştırıldığında, term sepsis grubunda prohepsidin düzeyi yüksek bulundu ($P= 0.013$) (Tablo 4.3.) (Şekil 4.6). Prematüre sağlıklı ve prematüre sepsis gruplarında yaş dağılımı uygun olmadığı için karşılaştırma yapılmadı.

Tablo 4.2. Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının tam kan sayımları *

Çalışma grubu	Term-sağlıklı (Sayı = 16)	Term-sepsis (Sayı =6)	P değeri
Hemoglobin[□]	14±1.3 (13.9)	14.2±2.2 (13.2)	
(g/dL)	12.2-17.1	12.5-17.4	
Hematokrit[□]	40.6±3.9 (40.6)	41.2±6.9 (39)	
(%)	35.5-49.6	33.3-50	
MCV[□]	97±3.8 (98)	96.3±6.1 (93.4)	
(fL)	87-101	90-105	
RDW[□]	15.7±1.2 (15.5)	18±2.6 (17)	
(%)	14-18	16-23	
Lökosit[□]	10490±1777	10676±5184	
(K/mm³)	(10800)	(10310)	
	7070-13100	3870-17100	
Trombosit	343000±87852	142383±89530	0.000**
(K/mm³)	(335500)	(127000)	
	235000-543000	47300-298000	

*Tüm değerler ortalama±standart deviasyon (ortanca),

minimum-maksimum olarak verilmiştir.

** P değerleri <0.05

□P değerleri >0.05

Tablo 4.3. Term sağlıklı ve term sepsis gruplarının demir parametreleri, CRP ve prohepsidin düzeyleri*

Çalışma grubu	Term-sağlıklı	Term-sepsis	P değeri
	(Sayı = 16)	(Sayı =6)	
Demir[□]	111.3±22.4	109.1±25.6	
(µg/dL)	(108.5)	(113)	
	71-159	77-139	
SDBK[□]	86.6±27.9	99.6±54.6	
(µg/dL)	(77)	(86.5)	
	55-157	37-189	
Tf satürasyonu[□]	14.1±5.3 (14.1)	14.9±11.1 (10.1)	
(%)	6-26.9	6.2-34.5	
Ferritin[□]	385.7±164.8	523±282.9	
(ng/mL)	(347.5)	(538)	
	101-706	131-931	
C-reaktif protein	0.3±1.2 (0)	26.5±40.7 (12)	0.014**
(mg/L)	0-5	1-107	
Prohepsidin	482±371.9	981.4±415.4	0.013**
(ng/mL)	(464.4)	(939.7)	
	76-1240	502-1527	

*Tüm değerler ortalama±standart deviasyon (ortanca), minimum-maksimum olarak verilmiştir.

**P değerleri <0.05

□P değerleri >0.05

Tablo 4.4. Preterm sağlıklı ve preterm sepsis gruplarının tam kan sayımları*

Çalışma grubu	Preterm-sağlıklı[□]	Preterm-sepsis[□]
	(Sayı =26)	(Sayı =15)
Hemoglobin	15.6±2.8 (15.5)	11.8±2 (12.2)
(g/dL)	10.5-21.5	7.4-14.9
Hematokrit	44.3±8.4 (43.9)	33.8±6.4 (35.1)
(%)	29.8-63.5	21.8-43.9
MCV	103±5.9 (103)	95.8±7.1 (95)
(fL)	91-115	84-112
RDW	16.5±1.6 (16)	17.4±2.3 (16)
(%)	14-22	15-22
Lökosit	8711±3658	13364±7524
(K/mm³)	(8685)	(15400)
	2150-16500	3400-25800
Trombosit	242058±100929	214993±167773
(K/mm³)	(222500)	(188000)
	75500-501000	11800-622000

*Tüm değerler ortalama±standart deviasyon (ortanca),

minimum-maksimum olarak verilmiştir.

[□]Bu iki grubun yaş dağılımı uygun olmadığından parametreler arasında karşılaştırma yapılmamıştır.

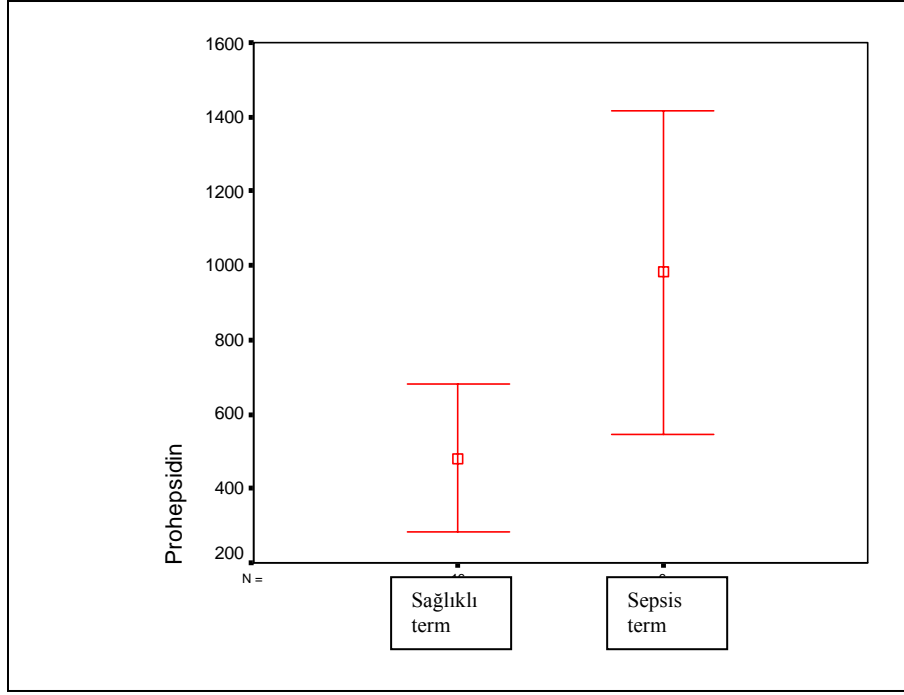
Tablo 4.5. Prematüre sağlıklı ve prematüre sepsis gruplarının biyokimyasal parametreleri*

Çalışma grubu	Preterm-sağlıklı[□]	Preterm-sepsis[□]
	(Sayı =26)	(Sayı =15)
Demir	97.1±50.9	95.3±44.6
(µg/dL)	(79.5)	(74)
	27-219	51-198
SDBK	101±49	94.6±49.5
(µg/dL)	(101)	(94)
	5-172	5-199
Tf satürasyonu	12.7±14.2 (7.9)	13.6±11.7 (6.9)
(%)	2.2-62.4	3-34
Ferritin	194.8±115.7	476.9±454.5
(ng/mL)	(165)	(318)
	23-463	67-1798
C-reaktif protein	1.3±2.1 (0)	38.6±27.7 (33)
(mg/L)	0-8	0-81
Prohepsidin	496.7±443.5	565.4±519.4
(ng/mL)	(231.3)	(537)
	48.4-1525	21.6-1407

*Tüm değerler ortalama±standart deviasyon (ortanca),

minimum-maksimum olarak verilmiştir.

[□]Bu iki grubun yaş dağılımı uygun olmadığından parametreler arasında karşılaştırma yapılmamıştır.

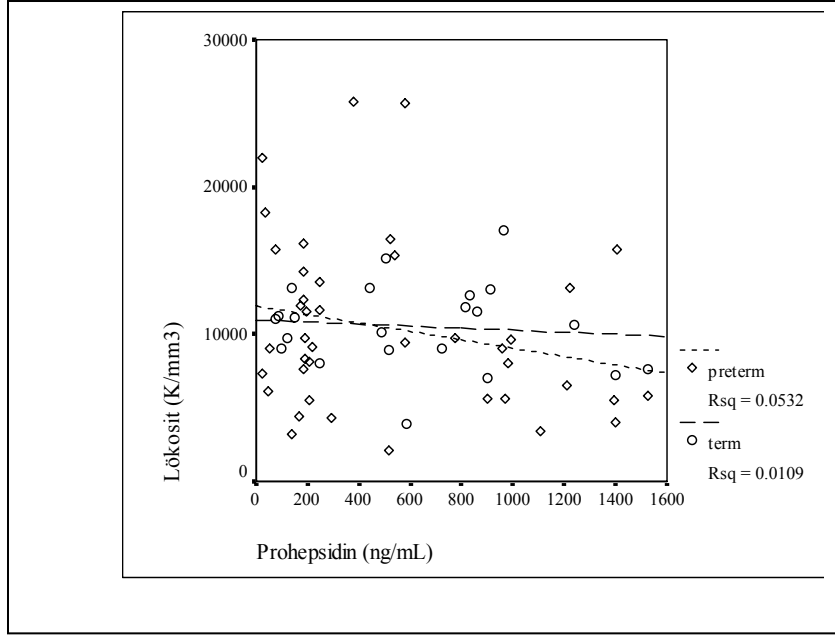


Şekil 4.6. Prohepsidin düzeylerinin sağlıklı term ve sepsisli term grupları arasındaki farkı

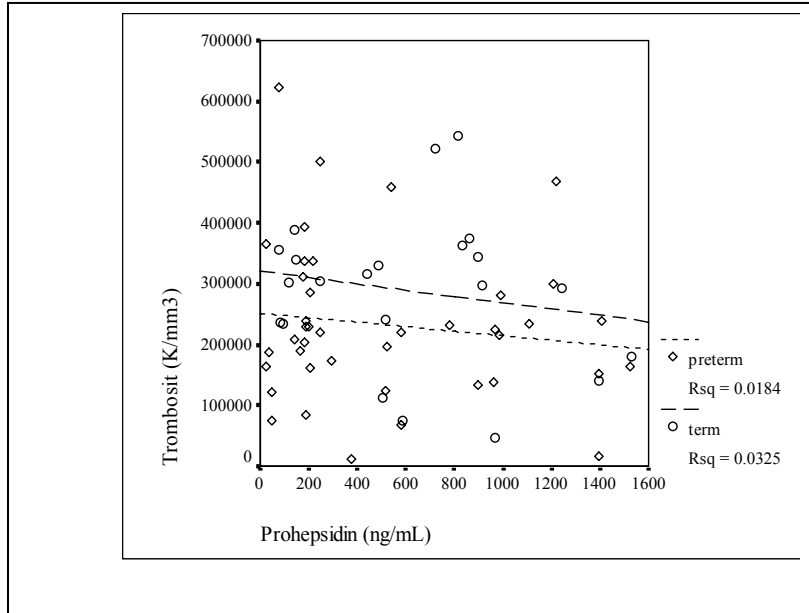
4.2.3. Prohepsidin düzeylerinin sepsis parametreleri ile ilişkisi:

Term bebeklerde, prohepsidin düzeyleri ile lökosit sayıları (Rsq: 0.0109), trombosit sayıları (Rsq: 0.0325), C-reaktif protein düzeyleri (Rsq: 0.0048) ve ferritin düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı (Şekil 4.7., 4.8., 4.9., 4.10.).

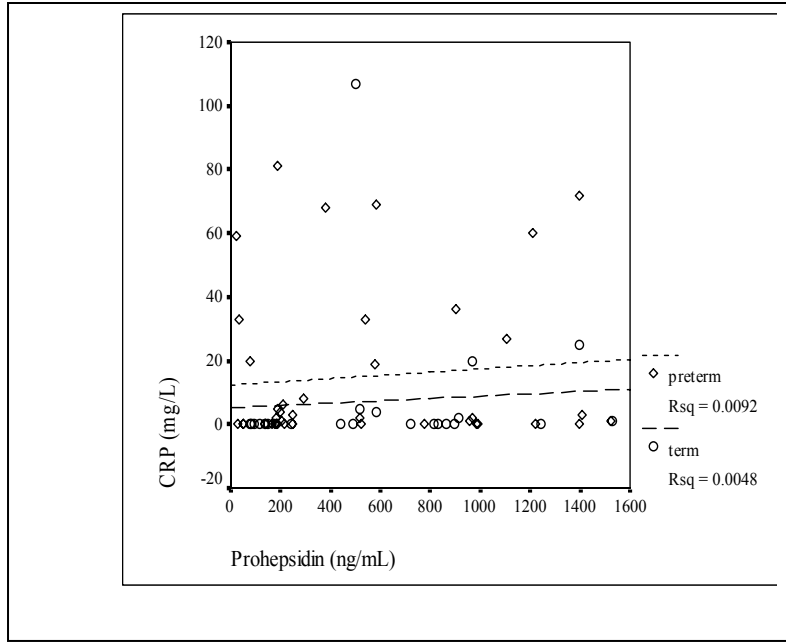
Prematüre bebeklerde, örnekleme zamanı kontrol edilerek inceleme yapıldığında; prohepsidin düzeyleri ile lökosit sayıları (Rsq: 0.0532), trombosit sayıları (Rsq: 0.0184), C-reaktif protein düzeyleri (Rsq: 0.0092) ve ferritin düzeyleri arasında ilişki saptanmadı (Şekil 4.7., 4.8., 4.9.).



Şekil 4.7. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ve lökosit sayıları arasındaki korelasyon



Şekil 4.8. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile trombosit sayıları arasındaki korelasyon

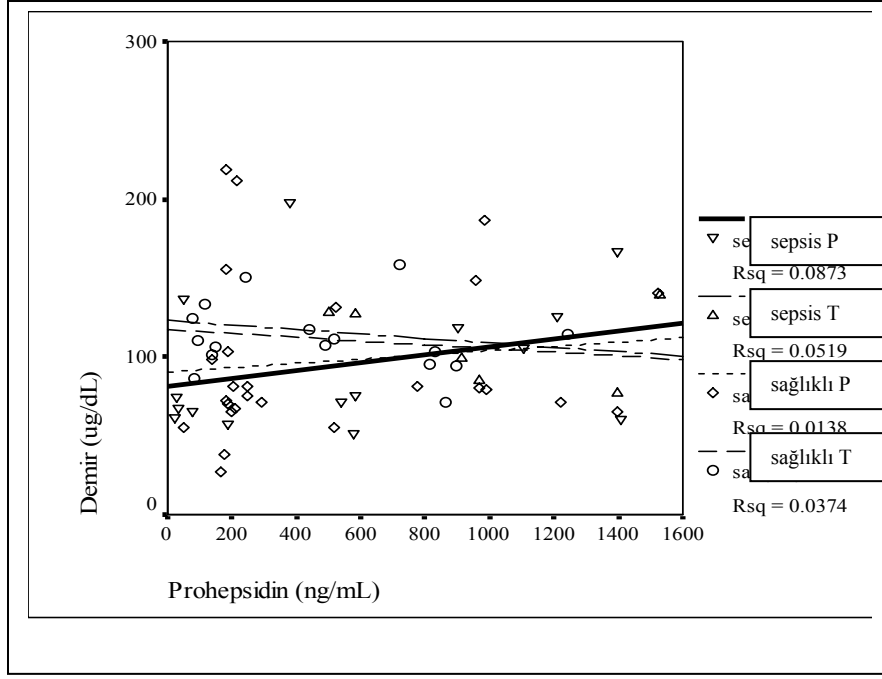


Şekil 4.9. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile CRP düzeyleri arasındaki korelasyon

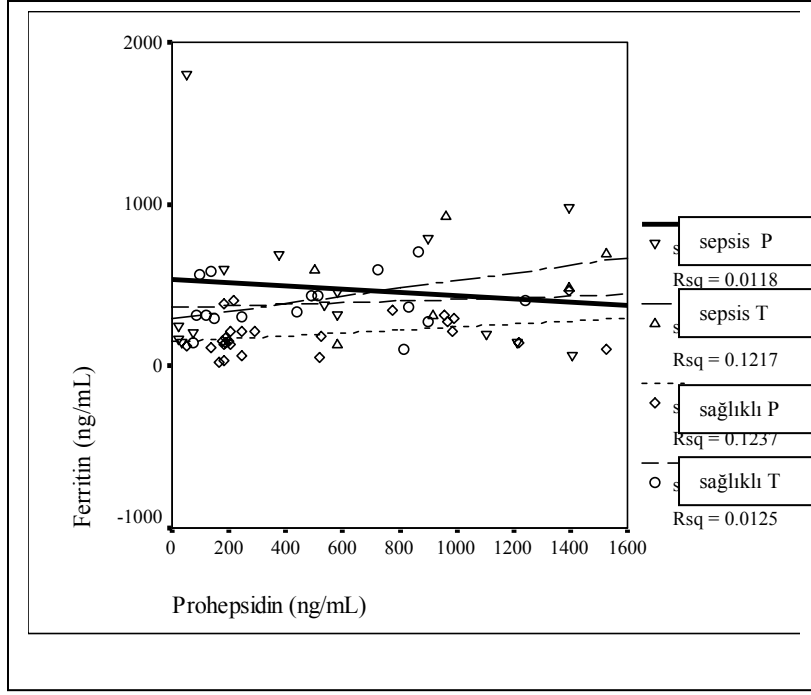
4.2.4. Prohepsidin düzeylerinin hematolojik ve demir parametreleri ile ilişkisi:

Prematüre sağlıklı ve term sağlıklı gruplarında prohepsidin düzeyleri ile hemoglobin, hematokrit, RDW, MCV, serum demiri (Rsqr: 0.0138, 0.0374), serum demir bağlama kapasitesi, transferrin saturasyonu (Rsqr: 0.0000, 0.0186) ve ferritin (Rsqr: 0.1237, 0.0125) düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı (Şekil 4.10.,4.11.,4.12.).

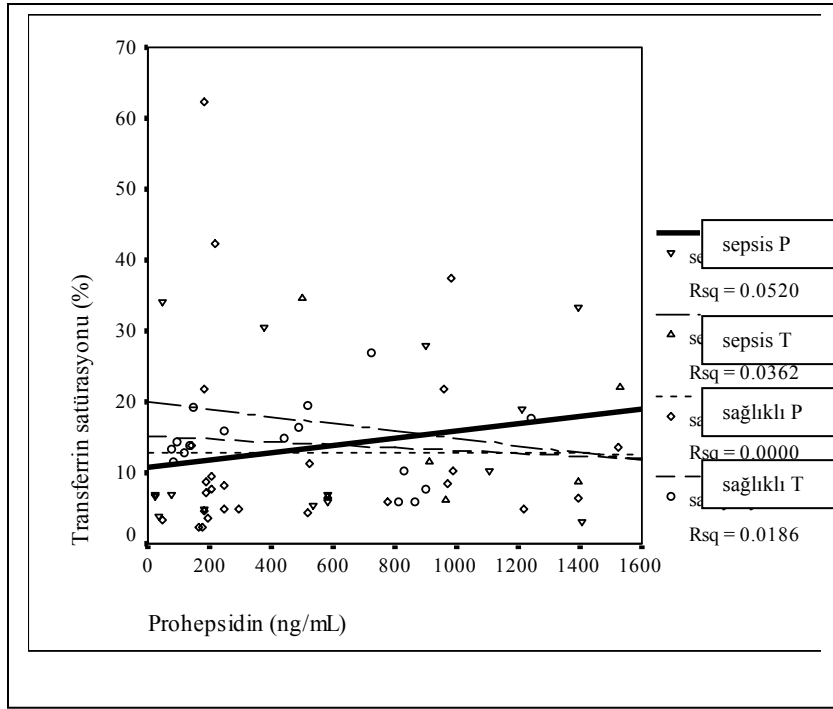
Prematüre sepsis ve term sepsis gruplarında prohepsidin düzeyleri ile hemoglobin, hematokrit, RDW, MCV, serum demiri (Rsqr: 0.0873, 0.0519), serum demir bağlama kapasitesi, transferrin saturasyonu (Rsqr: 0.0520, 0.0362) ve ferritin (Rsqr: 0.0118, 0.1217) düzeyleri arasında ilişki bulunmadı (Şekil 4.10.,4.11.,4.12.).



Şekil 4.10. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile demir düzeyleri arasındaki korelasyon



Şekil 4.11. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile ferritin düzeyleri arasındaki korelasyon



Şekil 4.12. Çalışma gruplarında prohepsidin düzeyleri ile transferrin satürasyonları arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

Hepsidin, son yıllarda tanımlanmış ve demir regülasyonunda önemli rolü olduğu bilinen bir peptiddir (1). Hepsidin, demirin intestinal absorpsiyonunu, makrofajlardan salınımını ve depolanmasını düzenlediği gösterilmiştir (1, 4). Hepsidin transplental demir geçişinden de sorumlu olduğu bir fare çalışmasında gösterilmiştir (4). Ancak fetal ve yenidoğan döneminde hepsidin ile ilgili yapılmış insan çalışması yoktur. Bu çalışmada term sağlıklı ve prematüre sağlıklı yenidoğan bebeklerde, term ve prematüre sepsisli yenidoğan bebeklerde hepsidin öncül proteini olan prohepsidin düzeyleri çalışılmış, prohepsidin düzeylerinin tam kan sayımı, demir parametreleri ve sepsis ile ilişkisi araştırılmıştır.

Term ve prematüre bebeklerde prohepsidin serum düzeyleri bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda, sağlıklı term grubun (n: 16) serum prohepsidin düzeyleri $482 \pm 371,9$ ng/mL (ortalama: 464,4) (aralık: 76-1240), sağlıklı prematüre grubun (n: 26) serum prohepsidin düzeyleri $496,7 \pm 443,5$ ng/mL (ortalama: 231,4) (aralık: 48,4-1525) bulundu. Sağlıklı term ve prematüre grupları arasında prohepsidin düzeyleri açısından fark bulunmadı. Sağlıklı erişkin 26 bireyi kontrol grubu olarak alan bir çalışmada, serum prohepsidin düzeyleri ortalama \pm SEM değeri $106,2 \pm 32,8$, aralığı 51,6-153,4 ng/mL ölçülmüştür (19). Yaşları 4-12 ay arasında bulunan 90 süt çocuğunda ölçülen serum prohepsidin düzeyleri ise 15-820 ng/mL (ortalama: 99) bulunmuştur (20). Bu sonuçlar sağlıklı term ve prematüre yenidoğan bebeklerde prohepsidin düzeylerinin dağılım aralığının geniş olduğunu, sağlıklı erişkin ve süt çocuğu düzeylerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Yenidoğan döneminde prohepsidin yüksek bulması; yenidoğanda erken postnatal dönemde hemoglobin yüksekliği, eritrosit yaşam süresinin kısalığı ve eritropoezin azalmasına bağlı olabilir (21). Bu dönemde yıkılan eritrositlerden açığa çıkan demir de depolanır, geçici

ve göreceli bir ferritin yüksekliği izlenir. Eritropoezin sınırlı olduğu bu dönemde demir ihtiyaca göre fazladır. Prematüre yenidoğan bebeklerde anemiye eritropoetin yanıtı da yetersizdir (21). Eritropoetinin karaciğerde hepsidin gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (17). Yenidoğan bebeklerde, serum prohepsidin düzeylerindeki artış kısmen yetersiz eritropoetin ile de açıklanabilir. Kulaksız ve arkadaşlarının çalışmasında kronik böbrek yetmezlikli hastaların ortalama serum prohepsidin düzeyi 148,1 ng/mL olarak sağlıklı grubun ortalama serum prohepsidin düzeyinden yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik, prohepsidin klirensinin böbrek yetmezliğine bağlı azalması ile açıklanmıştır (19). Yenidoğan bebeklerde serum prohepsidin düzeylerinin yüksekliği de kısmen glomerüler filtrasyon hızının fizyolojik düşüklüğüne bağlı olabilir.

Hepsidin doğal bağışıklık sistemine ait bir antibakteriyel peptiddir. Bu etkisini mikroorganizma membranında harabiyet yaparak gösterir. Mikroorganizmalar kendilerini hostun oksijen radikallerinden koruyan süperoksit dismutaz enziminin üretimi için demiri kullanırlar. İnflamasyon durumunda hepsidin demirin düşmesine neden olur. Bakterilerin yaşaması için uygun olmayan çevre koşulları yaratır (22). Prohepsidin yenidoğan döneminde doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olması nedeni ile de yüksek bulunuyor olabilir.

Ek olarak, yenidoğanda prohepsidin yüksek olması, hepsidin yüksekliğini yansıtmayabilir. Prohepsidin bir öncül proteindir. Erişkinde hepsidin ile korele olmasına rağmen, yenidoğanda aktif protein düzeyi ve degradasyon ürünleri bilinmemektedir.

Term ve prematüre bebeklerde serum prohepsidin düzeylerinin doğum ağırlığı ve örnek alınma günü ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Preterm sağlıklı bebeklerde ayrıca prohepsidin düzeylerinin gebelik haftası ile de ilişkili olmadığı görülmüştür. Term ve prematüre bebeklerde prohepsidin düzeyleri farklı bulunmamıştır. Bu sonuç, term ve

prematüre bebeklerde örnek alma günlerinin farklı olmasına bağlı olabilir, ileriye doğru planlanmış (kord kanı ile başlayan) kohort çalışmaları ile doğrulanmalıdır.

Term sağlıklı, prematüre sağlıklı, term sepsis ve prematüre sepsis gruplarında serum prohepsidin düzeyleri ile hemoglobin, hematokrit, RDW, MCV, serum demiri, serum demir bağlama kapasitesi, transferrin saturasyonu ve serum ferritin düzeyleri arasında ilişki bulunmadı. Sağlıklı kontrol, herediter hemakromatozis, renal anemili ve kronik böbrek yetmezlikli hastalarda serum prohepsidin düzeyleri, serum demiri, ferritin ve transferrin saturasyonu ilişkisi bakılan bir çalışmada, bu parametrelerle serum prohepsidin düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Bu sonuç araştırmacılara, serum prohepsidin düzeyinin düzenlenmesinin, birçok kompleks ve indirekt etkiler içeren bir süreç olduğunu düşündürmüştür (19). Süt çocukluğu döneminde demir profilaksisi alan 7-12 aylık bebeklerde ve demir profilaksisi veya demir tedavisi almayan 4-6 aylık bebeklerde serum prohepsidin düzeyleri ile ferritin düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır (20). Taes ve arkadaşlarının çalışmasında 46 erişkin renal yetmezlikli hastada renal fonksiyon, serum prohepsidin düzeyleri ve demir parametreleri karşılaştırılmış. Serum prohepsidin düzeyleri ile eritrosit sayısı, hemoglobin konsantrasyonları ve hematokrit düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Serum prohepsidin düzeyleri ile serum demir, transferrin, transferrin saturasyonu ve serum ferritini arasında ilişki bulunmamıştır (23). Bizim sonuçlarımız sunulan çalışmalarla uyumludur. Demir ve hematolojik parametrelerle bir paralellik saptanamaması prohepsidin düzenlenmesinin sadece demir metabolizmasından etkilenmeyen, karmaşık bir kontrol sonucu olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda term sağlıklı ve term sepsis grupları arasında serum prohepsidin düzeylerinin ortalamaları karşılaştırıldığında, term sepsis grubunda serum prohepsidin

düzeylerinin önemli oranda yüksek olduğu tespit edildi (P=0.013). Term bebekler sağlıklı ve sepsisli bir grup olarak alındığında, serum prohepsidin düzeyleri ile lökosit sayıları, trombosit sayıları, C-reaktif protein düzeyleri ve ferritin düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı. Prematüre bebeklerde, örnekleme zamanı kontrol edilerek inceleme yapıldığında; benzer şekilde bu parametreler ile ilişki saptanmadı.

Enfeksiyonun insanda hepsidin idrarla ekskresyonunu 100 kat arttırdığı saptanmıştır (10). Farelerde turpentin enjeksiyonu sonrası hepsidin mRNA'sının 6 kat arttığı ve serum demirinin 2 kat azaldığı tespit edilmiştir (4). Beyaz levreklerin *Streptococcus İniae* ile enfeksiyonunda hepsidin mRNA ekspresyonu 4500 kat artmıştır (24). Hepsidin düzeyi inflamasyonda artmaktadır ve hepsidin akut faz reaktanı gibi davranmaktadır (11). Nemeth E ve arkadaşlarının çalışmasında altı sağlıklı erişkin gönüllüye rekombinan insan interlekin-6 (IL-6)'sı 30 µg/saat dozunda 3 saat verilmiştir. Serum örnekleri infüzyon başlangıcında, infüzyonun 3. saatinde ve infüzyon bittikten 2 saat sonra alınmıştır. İdrar örnekleri 24 saat toplanmıştır. IL-6 infüzyonunun ilk 2 saati içerisinde hepsidin ekskresyonunun hızla arttığı gözlenmiştir. Üriner hepsidin düzeylerinin 2. saatte 0. saate göre 7,5 kat arttığı tespit edilmiştir. IL-6 infüzyonu serum demir ve transferrin saturasyonunu azaltmıştır. İnfüzyonun 2. saatinde preinfüzyon değerlerine göre serum demiri % 34, transferrin saturasyonu % 33 azalmıştır. Aynı çalışmada farelerin diyetdeki demir alımı arttırıldığında, ilk doz demirden 24 saat sonra hepsidin ekspresyonunun 5,4 kat arttığı gösterilmiştir (25).

Lipopolisakkarit (LPS) ile in vivo insan endotoksemisi oluşturulan diğer bir çalışmada, on tane sağlıklı gönüllü erişkine LPS enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası 3. saatte IL-6 artmış ve 6. saatte üriner hepsidin düzeyi pik yapmıştır. İzleyen dönemde serum demir düzeyi düşmüştür. Serum prohepsidin düzeyi 22 saat boyunca anlamlı bir değişime uğramamıştır. C-reaktif protein maksimum düzeyine LPS enjeksiyonundan 22 saat sonra ulaşmıştır. Serum ferritin düzeyleri 6 saat sonra az bir artma göstermiştir ve 22 saat sonra

normal düzeylerinde bulunmuştur. Bu durum akut faz reaktanı olan ferritinin hepsidine göre daha geç yanıt verdiğini düşündürmüştür. Üriner hepsidin ve serum prohepsidin konsantrasyonları arasındaki ilişki azdır. Serum prohepsidin konsantrasyonunun inflamasyonu ya da demir metabolizması değişikliklerini yansıtmayabileceği şeklinde yorumlanmıştır (26).

Sonuç olarak bu çalışmada, term ve prematüre sağlıklı yenidoğan bebeklerde serum prohepsidin düzeyleri kesitsel olarak belirlenmiştir ve aralarında fark bulunmamıştır. Bu düzeyler erişkin ve süt çocuğu ortalama değerlerinden yüksektir. Bu sonucun klinik etkilerini gösterebilmek için farklı klinik tablolarda (gebelik haftasına göre küçük, anemik, perinatal hipoksiden geçmiş ve siyanotik konjenital kalp hastalıklı yenidoğan bebekler) prohepsidin düzeyleri ölçülmelidir. Ayrıca prohepsidin hem prematüre doğan, hem de term bebeklerde kord kanından başlayan kohort çalışmalarla ölçülmesi yararlı olabilir.

Enfeksiyonda arttığı bilinen hepsidinin bu çalışmada term sepsisli grupta yüksek olduğu görüldü. Bu hepsidinin bir akut faz reaktanı olarak da kullanılabileceğini düşündürmüştür. Prohepsidin bir antibakteriyel peptid olarak, anne sütünde bulunması olasıdır. Anne sütünde çalışılması, varlığında biyoaktivitesi ve işlevlerinin araştırılması, anne sütünün doğal bağışıklık sistemindeki ve demir emilimindeki rolüne de ışık tutacaktır.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışma yenidoğan döneminde prohepsidin düzeyini gösteren ilk çalışmadır. Term ve preterm sağlıklı yenidoğanlarda erişkin düzeylerine göre daha yüksek düzeylerin söz konusu olduğu görülmüştür.
2. Tam kan sayımı, demir parametreleri ile serum prohepsidin düzeylerinin korelasyonu gösterilememiştir.
3. Term sepsis grubunda prohepsidin düzeyi, sağlıklı gruba göre yüksek bulundu ($P=0.013$). Oysa bu örneklerde ferritin düzeylerinde fark yoktu.
4. Enfeksiyon parametreleri ile serum prohepsidin düzeylerinin de ilişkili olmadığı bulunmuştur.
5. Doğum ağırlığı, gebelik haftası, örnekleme günlerinin serum prohepsidin düzeylerini etkilemediği görüldü.

KAYNAKLAR

1. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 7806-7810.
2. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Krappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480(2-3): 147-150.
3. Politou M, Papanikolaou G. Heparin: A key iron regulator involved in the pathogenesis of anaemia of chronic disease. *Haema* 2004; 7(2): 165-174.
4. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4596-4601.
5. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human heparin, a peptid hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 37597-37603.
6. Kluver E, Schulz A, Forssmann WG, Adermann K. Chemical synthesis of beta defensins and LEAP-1/heparin. *J Pept Res* 2002; 59: 241-248.
7. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276: 7811-7819.
8. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29(3): 336-355.
9. Lanzkowsky P. Iron deficiency anemia. In Lanzkowsky P (ed), *Images*, 3rd edd. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Third edition. 2000 (3); 33-49.

10. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; 341: 1986-1995.
11. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-2463.
12. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Khan A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8780-8785.
13. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4596-4601.
14. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulge CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002; 123(3): 835-844.
15. Nicolas G, Chouvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110(7): 1037-1044.
16. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia chronic disease. *Blood* 2002; 100(10): 3776-3781.
17. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Heparin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 327-335.
18. Fleming RE, Sly WS. Heparin a putative iron regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8160-8162.

19. Kulaksız H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruekner T, Kallinowski B, Stremmel W. Pro-hepcidin expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 2004; 53: 735-743.
20. Şimşek F, Ulukol B, Hanoluk A, Akar N. IX. Ulusal Hematoloji Kongresi. Bildiri: 353, poster: 263.
21. Rao R, Georgieff MK. Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatrica Suppl.* 2002; 438: 124-129.
22. McGrath JrH, Rigby PG. Heparidin: inflammation's iron certain. *Rheumatology* 2004; 345-347.
23. Taes YE, Wuyts B, Boelaert JR, De Vriese AS, Delanghe JR. Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med* 2004 Apr; 42(4): 387-389.
24. Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Olst JCV, Shimizu C, Bulet P, Burns JC. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem FEBS* 2002; 269: 2232-2237.
25. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Sarah T, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The J Clin Inves* 2004;113(9): 1271-1276.
26. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, Hoeven HV, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005; May 10;(Epub ahead of print).

