



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİLİ HASTALARDA HÜCRESEL VE HUMORAL İMMÜNİTE

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

Dr. Ozan CENGİZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. V.Gürhan KADIKÖYLÜ

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİLİ HASTALARDA HÜCRESEL VE HUMORAL İMMÜNİTE

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ
Dr. Ozan CENGİZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. V.Gürhan KADIKÖYLÜ

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF Numaralı proje olarak desteklenmiştir.

AYDIN-2013

TEŞEKKÜR

İç hastalıkları eğitimim süresince bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. V.Gürhan KADIKÖYLÜ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde büyük emekleri bulunan saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Abdulvahit YÜKSELEN, Prof. Dr. Ali Önder KARAOĞLU, Prof. Dr. Engin GÜNEY, Prof.Dr. Hadi YAŞA, Prof.Dr. Harun AKAR, Prof. Dr. Hulki Meltem SÖNMEZ, Prof. Dr. Nezih MEYDAN, Prof. Dr. Sabri BARUTCA, Prof. Dr. Taşkın ŞENTÜRK, Prof. Dr. Yavuz YENİÇERİOĞLU, Prof. Dr. Zahit BOLAMAN, Doç. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU, Yard. Doç. Dr. Adil COŞKUN, Yard. Doç. Dr. Mediha AYHAN' a ve tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'e ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Neriman AYDIN' a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ozan CENGİZ

Aydın, 2013

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ.....	2
2.1.1. Demir Eksikliğinde Klinik Bulgular.....	2
2.1.2. Demir Eksikliğinin Evreleri.....	2
2.1.3. Demir Eksikliği Nedenleri.....	4
2.1.4. Demir Eksikliğinde Laboratuvar Bulgular.....	6
2.2. SİTOKİNLER.....	11
2.2.1. Sitokinler ve immün sistemdeki roller.....	11
2.2.2. Normal İmmünitede Sitokinler.....	12
2.3. İMMÜNOGLOBULİNLER.....	14
2.3.1. İmmünoglobulinlerin Yapısı.....	14
2.3.2. İmmünoglobulin Alt Grupları.....	16
2.4. KOMPLEMAN SİSTEMİ.....	17
2.5. DEMİR VE İMMÜNİTE.....	19
2.5.1. Demirin immünite üzerine etkileri.....	19
2.5.2. Sitokinler aracılığıyla demir homeostazının regülasyonu.....	20
2.5.3. İmmün fonksiyonun demir ile regülasyonu.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Etik kurul onayı.....	24
3.2. Hasta ve kontrol gurubu.....	24
3.3. Örneklerin hazırlanması.....	24
3.4. Hematolojik parametreler.....	25
3.5. Biyokimyasal analizler.....	25
3.6. Akım sitometrik incelemeler.....	25
3.7. Mikrobiyolojik incelemeler.....	25
3.8. İstatistiksel yöntem.....	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA.....	29
6.ÖZET.....	34

7. SUMMARY.....	35
8. KAYNAKLAR.....	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-I: Demir eksikliği anemisi nedenleri

Tablo-II: Demir eksikliğinde laboratuvar incelemeleri

Tablo-III: Demir eksikliğini anemisi ve kronik hastalık anemisi arasındaki farklar

Tablo-IV: Demir depo ölçümleri

Tablo-V: Demir eksikliği anemili hastalar ile kontrol grubunun demografik verileri

Tablo-VI: Demir eksikliği anemili hastalarda etiyoloji

Tablo-VII: Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının tam kan değerleri

Tablo-VIII: Demir eksikliği anemili hastalarda demir parametreleri

Tablo-IX: Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının hücresel immünite verileri

Tablo-X: Hasta ve kontrol grubunun immün parametreleri

KISALTMALAR

DEA: Demir eksikliği anemisi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

CD: Cluster of diferantiation

NK: Natural killer

İL: İnterlökin

Ig: İmmunglobin

C: Kompleman

OEH: Ortalama eritrosit hacmi

OEHb: Ortalama eritrosit hemoglobini

OEHK: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

TDBK: Total demir bağlama kapasitesi

TRP: Serum transferrin reseptör protein

HRI: Hem-regule translasyonel inhibitor

Th: T helper

RDW: Red Cell Distrubition Width- Eritrosit dağılım genişliği

SD: Serum demir

KHA: Kronik hastalık anemisi

Hb: Hemoglobin

TS: Transferin saturasyonu

TFR: Hücre membrane transferin reseptörü

TNF: Tümör nekroz factor

APC: Antijen sunan hücre

IFN: Interferon

TGF: Transforming growth factor

MCP: Monosit chemoattractant protein

PG: Prostoglandin

HLA: Human leukocyte antigeni

ABD: Amerika birleşik devleti

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

CRP: C reaktif protein

L: Hafif

H: Ağır

VL: L zinciri değişken bölgesi

VH: H zinciri değişken bölgesi

CL: L zinciri sabit bölgesi

CH: H zinciri sabit bölgesi

D: Çeşitlilik

JL: L zinciri bağlanma bölgesi

CDR: Complementarity determining regions

e-ALAS: Eritroid aminolevulinik asid sentetaz

IRE: Iron responsive elements

IRP: Iron regulatory proteins

GTP: Guanozin trifosfat

NO: Nitrik oksid

NOS: Nitrik asid sentetaz

ICAM: Intercellular adhesion molecule

NRAMP-1: Natural resistance-associated macrophage protein-1

IREG: Iron regulated transporter

DMT: Divalent metal transporter

HFE: High fe

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demir eksikliği anemisi (DEA) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre Dünya'da en sık eksiklik hastalığı olup gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki halk sağlığı sorunudur (1). Bölgesel farklılıklar görülse de ülkemizdeki DEA prevalansı %16-24'dür (2,3). DSÖ tarafından son olarak 2008 yılında yayınlanan prevalans verilerine göre ülkemiz için gebe kadınlarda %40 seviyesinin üzerine çıkarak önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (4). Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III) verilerine göre 1988-1994 yılları arasında erişkinlerin %1-2'sinde DEA mevcuttur (5). Anemi olmadan demir eksikliği ise erkeklerde %4 iken, çoğunluğu premenopazal olan kadınlarda bu oran %11'dir. Yine bu verilere göre ise yaş arttıkça DEA sıklığında artış gözlenmektedir. Bu oran 65 yaşında %12 iken 65 yaş üzerinde %17'dir.

Demirin immün hücreler için büyümeyi uyarıcı, sitokin aktivitesindeki ve hücre aracılı immün efektör yollarına olan etkisinin saptanmasıyla günümüzde immünitinin devamlılığının sağlanmasında önemi anlaşılmıştır (6-9). Demir eksikliği ve demir birikiminin T ve B lenfositler ile natural killer (NK) hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyonunu değiştirerek immüniteyi etkiledikleri gösterilmiştir (10-13). Sıçanlarda deneysel olarak demir aşırı yüklenmesinin CD4+ helper ve CD8+ supresör/sitotoksik oranını CD8+ supresör hücrelerinin artmasını sağlayarak değiştirdiği gösterilmiştir (10). Demir eksikliğinde özellikle gecikmiş hipersensitivite yanıtları, T lenfosit proliferasyonu, NK hücre aktivitesi, nötrofillerin solunumsal patlaması (burst), mieloperoksidaz aktivitesi ve bakterisidal etkinin azalması gibi olaylarda önem taşımaktadır. Bunun yanında nötrofil fagositozu ve B hücre fonksiyonlarında etkilenme görülmemektedir (14-20). Ancak DEA'de hücresel immunitedeki azalmanın mekanizması tam olarak açık değildir. Demir eksikliğinin humoral immünite üzerinde rolü tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda demir eksikliğinde immunglobulin düzeyleri araştırılmıştır (15,21-25). Ancak halen görüş birliği sağlanamamıştır. Ülkemizde bu konuda çocuk yaş grubunda yapılmış çalışma mevcutken erişkinlerde yapılmış çalışma mevcut değildir.

Bu tezde DEA'nde hücresel ve humoral immünitinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için DEA tanısı koyulan erişkin hastalarda hücresel immüniteyi değerlendirmek için periferik kandan akım sitometrik yöntem ile lenfosit alt gurupları (CD3, CD4, CD5, CD8, CD19 ekspresyonları, CD4/CD8 oranı) ve ELISA yöntemiyle lenfositlerden salgılanan serumdaki interlökinlerin (IL-2, IL-4, IL-6) düzeyi incelendi. Humoral immünite ELISA yöntemi ile serumdaki (immunglobin) IgA, IgM ve IgG, kompleman C3 ve C4 düzeyleri ile araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ

2.1.1. Demir Eksikliğinde Klinik Bulgular

DEA ile başvuran erişkin hastalarda genellikle başlangıç semptomları anemiye bağlıdır ve güçsüzlük, baş ağrısı, irritabilite, değişken derecelerde halsizlik ve egzersiz intoleransıdır. Ancak hastaların bazıları asemptomatiktir veya demir ile başarılı tedavi sonrası hastalar bu durumun farkına varabilirler. Bu semptomların benzeri anemik olmadan ferritin düzeyi düşük hastalarda da gözlenebilir. Plummer-Vinson sendromu (disfaji, özofageal web, atrofik glossit ve demir eksikliği anemisi), kaşık tırnak görünümü, klorosis ve mavi skleralar gibi 20.yüzyıl başlarında tipik olarak gözlenen bulgular artık tarihi değere sahiptir (26,27). Ancak anemi olsun olmasın demir eksikliği hastalarının bir kısmında dil ağrısı, azalmış sekresyonlara sekonder ağız kuruluğu, dil papillalarının atrofisi ve alopesi gözlenebilir (28,29). İleri yaştaki hastalarda anemiye eşlik eden komorbiditelerde ekzeserbasyona yol açabilir ve kardiyak/nörolojik bozukluklar ortaya çıkabilir (30).

Pika ve pagofaji: Pika gıda dışı maddelere yönelmiş iştah artışı olup tipik örnek olarak toprak ve kağıt parçaları verilebilir. Farklı kültür ve etnik yapılarda farklı etkenlerle izlenebilmektedir (31,32). Buz için olan pika ise pagofaji olarak adlandırılır ve demir eksikliği tablosu için nerdeyse spesifik kabul edilir (33). Anemik olmayan demir eksikliği vakalarında da gözlenebilir ve demirle tedaviye hızla yanıt verir. Gastrointestinal kan kaybına sekonder demir eksikliği olan 55 hastanın incelendiği bir çalışmada pika 32 hastada, pagofaji ise 28 hastada saptanmıştır (34).

Huzursuz bacak sendromu: Demir eksikliği huzursuz bacak sendromunun sık rastlanan nedenlerinden birisidir, yapılan bir çalışmada demir eksikliği ile başvuran hastalarda huzursuz bacak sendromu sıklığı normal popülasyona göre dokuz kat artmış bulunmuştur (35).

2.1.2. Demir Eksikliğinin Evreleri

Vücutta normalde demir deposu 3-4 gram olup yaklaşık yarısını hemoglobin diğer kısmını demir içeren proteinler oluşturmaktadır. Erişkin bir erkekte ise depo demir yaklaşık olarak 10 mg/kg olarak bulunurken büyük kısmı karaciğer, dalak ve kemik iliğinde toplanmıştır (36). Kadınlarda ise bu miktar menstrüasyon, gebelik, doğumlar ve laktasyon gibi nedenlerle daha düşüktür. Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yapılan bir çalışmada depo demiri 20-45 yaş arası kadınların %93'ünde 5.5 ± 3.4 mg/kg bulunurken, geri kalan %7'sinde 3.9 ± 3.2 mg/kg ile demir eksikliği saptanmıştır (36). Yine ABD verilerine göre menstrüasyon dönemindeki kadınlarda demir depolarındaki eksiklik oranı % 20 düzeylerindedir (37).

Demir eksikliği hareketli hale getirilebilir demir depoları olmayan, mikrositik hipokromik bozukluktur, diğer tüm bozukluklarda depo demiri normal veya artmıştır. Kronik, uzun süren DEA, çok soluk, biçimsiz eritrosit gözlenen ağır mikrositoz ve hipokromiye ve ortalama eritrosit hacmi (OEH), ortalama eritrosit hemoglobini (OEHB) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunda (OEHK) belirgin azalmaya neden olabilir. Bunun yanı sıra hafif demir eksikliği anemili bazı hastalarda normositer-normokrom/hipokrom eritrositler izlenebilir (38).

Demir eksikliği oluşumu üç aşamaya ayrılır (39, 40):

1-Prelatent demir eksikliği: Vücudun demir ihtiyacının ya da kan kaybının diyetten emilim kabiliyetini aştığı negatif demir dengesidir. Demir açığı karaciğer, dalak ve kemik iliğinden demirin mobilizasyonu ile kapatılır. Ferritin düzeyi ya da kemik iliği aspirasyonlarında boyanabilir demirin oranı düşecektir. Serum demir, total demir bağlama kapasitesi düzeyleri (TDBK) ve serbest eritrosit protoporfirin düzeyi normal sınırlarda kalır. Bu aşamada eritrosit morfolojisi ve ölçütleri normaldir.

2-Latent demir eksikliği: Eritropoez aşamasıdır. Demir depoları tükendiğinde, serum demiri düşmeye başlar, yavaş yavaş TDBK ve serbest eritrosit protoporfirin düzeyi artmaya başlar. Serum ferritin düzeyi $<15 \mu\text{g/l}$ olduğunda ilik demir depoları tükenmiştir. Transferrin saturasyonu %15-20'ye düştüğünde, hemoglobin sentezi bozulur. Periferik yaymada mikrositik hücrelerin ilk görünüşleri ortaya çıkar ve dolaşımda hipokromik retikülositler görülür. Bu evre transferrin saturasyonunun kontrolü ile saptanabilir.

3-Belirgin DEA: Hematolojik ve hematoloji dışı belirtilerin eşlik ettiği, hemoglobinin düştüğü ve eritrosit sayısının azaldığı ve eritrositlerde hipokromi ve mikrositozun belirginleştiği dönemdir. Hematokrit değeri % 31-32 nin altına düştüğünde eritrosit indeksleri mikrositik olur (41). Demir eksikliğin en tipik laboratuvar bulgusu OEH'nin 80 fL altında, OEHK'nın 27 pikogramdan küçük olmasıdır (41,42). Demir eksikliği anemisi ile birlikte B₁₂ veya folik asit eksikliği de varsa (dimorfik anemi) OEH normal sınırlar içinde olabilir. Hasta semptomatik hale gelmiş ise hemoglobin $< 8 \text{ gr/dL}$ 'dir (41).

Kemik iliği ve eritropoetin yanıtları: Son dönemlere kadar bir yanda demir ve hem senteziyle diğer yanda globin sentezi arasındaki dengenin nasıl sağlandığı tam olarak anlaşılamamıştır. Klinik gözlemlerle demir ve ona bağlı hem eksikliğin globin sentezinde azalmaya yol açtığı ve bu durumun hafif düzeyde hipo-proliferasyonla giden bir anemi tablosuna yol açtığı net olarak saptanmıştır. Burada kilit rolü oynayan hem-regüle translasyonel inhibitör (HRI) adı verilen bir protein kinazdır. Demir/hem eksikliğinde HRI translasyonel başlatıcı faktör eIF2' nin alfa subünitesini fosforile eder, bu ünite globin

sentezini regüle eder. Bu durum hayvan deneylerinde HRI devre dışı bırakıldığında demir eksikliği indüklense bile hipokrom mikrositer aneminin oluşmamasıyla doğrulanmıştır (43). Demir eksikliği anemisinde eritopetin düzeyi artmıştır, ancak mutlak retikülosit sayısı demir eksikliği nedeniyle eritropez yavaşladığından azalmıştır.

2.1.3. Demir Eksikliği Nedenleri

Kan kaybı: Gelişmiş ülkelerde demir eksikliğin ana nedeni kan kayıplarıdır, bu durum sadece hasta öyküsünün bile yeterli olabileceği şekilde açık veya ancak laboratuvar yöntemleriyle saptanabilecek şekilde gizli olabilir. Belirgin kanama için tipik örnek olarak hemorajik travmalar, hematemez, melena, hemoptizi, ağır düzeyde menoraji ve hematüri verilebilir. Gizli kanama ise tipik olarak gastrointestinal yolla ve çoğunlukla erkeklerde gözlenir (44). Diğer nedenler ise tekrarlayan kan bağışları, bayanlarda doğum sırasındaki kayıplar, laktasyon ve gebelik süresinde ihtiyacın artışı gibi durumlardır. Demir alımındaki yetersizlik ve/veya gastrointestinal malabsorbsiyonu gibi nedenler de demir eksikliği gözlenirse de ilk planda eksikliğin kayıp nedeni olduğu düşünülerek altta yatan malignite veya kanamalı diğer hastalıkların araştırılması gereklidir (45). Örneğin NHANES-I çalışmasında DEA olan erkek ve postmenopozal kadınlarda iki yıl içinde gastrointestinal malignite görülme riski anlamlı olarak artmış bulunmuştur (46). 148 DEA'li hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada hastaların %12'sinde malignite saptanmıştır (47).

Azalmış demir emilimi: Demirin malabsorbsiyonu görece daha az sıklıkla demir eksikliği nedenidir ve sıklıkla aklorhidri ve malabsorbsiyon ile birlikte (45). Ancak gastrik asit sekresyonunu azaltan proton pompa inhibitörlerinin kullanımı klinik demir eksikliği ile ilişkili bulunmamıştır. Oksalat, fitat ve fosfatlar demirle kompleks oluşturup demir emilimini azaltırlar. Hidrokinon, askorbat, laktat, piruvat, süksinat, fruktoz, sistein ve sorbitol gibi redüktif etkisi olan maddeler demir emilimini olumlu yönde etkilerler. Kırmızı şarap polifenoller içerdiği için demir emilimini azaltır. Mide sekresyonu, mide boşalma zamanı ve müküs sekresyonu da demir emilimine etki eder (48).

Özellikle demir tedavisine dirençli hastalarda diğer gastrointestinal nedenler (*Helicobacter pylori*, çölyak hastalığı, atrofik gastrit) akla getirilmelidir. Bir çalışmada DEA'nde tedavi yanıtı sızlığı tüm çölyak hastalarında izlenirken atrofik gastrit veya *Helicobacter pylori* saptananlarda yanıt sızlık oranı %70'lerde saptanmıştır (49). Çölyak hastalığı birtakım genetik predispozisyonu olan kişilerde buğday, çavdar ve arpa alımıyla prespite olan ince barsağın inflamatuvar bir hastalığıdır. Çölyak hastalığının oluşumunda çevresel ve genetik faktörler önemlidir. Buğday, gluten ve gliadinlerin alkolde çözünür protein fraksiyonu, çavdar ve arpadaki benzer prolamınler duyarlı bireylerde intestinal

inflamasyonu tetikler (50). Çölyak hastalığı erken olarak yaklaşık 2 yaşlarında diyetle buğdayın girmesiyle ortaya çıkar. Amerika Birleşik Devletlerindeki erişkin hastaların yaklaşık yarısı diyare ve diğer gastrointestinal semptomlar olmaksızın anemi ve osteoporoz ile ortaya çıkarlar. Bu kişiler muhtemelen demir, folat ve kalsiyum emiliminin bozulduğu proksimal tutulumlu hastalardır, kalan barsak yüzeyi diğer besinlerin emilimi için yeterlidir (51). Ciddi mukozal tutulumu olan hastalarda sulu diyare, kilo kaybı ve gelişme geriliği ile birlikte vitamin ve mineral eksikliklerinin klinik belirtileri görülür. Çölyak hastalığının tanısı ince barsak biopsisinde karakteristik değişikliklerin varlığı ve glutensiz diet ile iyileşmenin görülmesi ile konur. Mukozal düzleşme endoskopik olarak azalmış duodenal kıvrımlar ve duodenal taraklanma şeklinde görülür. İntestinal biopsideki karakteristik bulgular villus yokluğu, kript hiperplazisi, artmış intraepitelyal lenfositler ve lamina proprianın plazma hücreleri ve lenfositler tarafından infiltrasyonudur (52). Çölyak hastalığı tanısının desteklenmesinde, birinci derece akrabaların taramasında ve glutensiz diyetle cevabın takibinde serolojik belirteçler yararlıdır. IgA ve IgG antikorları sensitiftir ancak spesifik değildir. EMA IgA antikorları ileri teknik laboratuvarlarında indirekt immunofloresan yöntemi ile saptanır ve aktif hastalığı olanlarda yüksek düzeyde sensitif (%90) ve spesifiktir (%90-100) (53).

Diğer nedenler ise çeşitli ilaçların kullanımı (multivitaminler, kalsiyum, antiasitler, salisilat ve diğer NSAİ), intravasküler hemoliz, pulmoner hemosiderosis, kronik böbrek yetmezliği (KBY) nedeniyle hemodiyaliz, obezite cerrahisi ve paraziter hastalıklardır (54). Birçok memeli hayvanda parazitlenen çengelli solucanlar Ancylostomatidae ailesi içinde yer alırlar. Hemen hemen bütün insan infeksiyonları için etkenler Ancylostoma duodenale ve Necator americanus'tur. Bu parazitlere tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sık rastlanmakta ve dünyada yaklaşık olarak bir milyar insanı enfekte ettiği tahmin edilmektedir (55). A.duodenale Avrupa, Afrika, Çin, Japonya, Hindistan ve Pasifik Adalarında, N.americanus ise Amerika, Karayipler, Afrika, Asya ve Pasifik'te bulunmaktadır (56). Yurdumuzda nekatoriyaza Doğu ve Orta Karadeniz Bölgesinde, ankilostomiyaza ise Karadeniz Bölgesi ve Doğu Akdeniz Bölgesinde rastlandığı bildirilmektedir (57-62). Kronik nekatoriyaz veya ankilostomiyazda anemi ve sindirim sistemi bozuklukları başta gelir. Hastada kaybedilen kan yerine konulamadığı zaman, hastalığın temel belirtisi olan hipokrom-mikrositer anemi gelişir. Hastalığın ileri dönemlerinde aneminin şiddetine paralel olarak konjestif kalp yetmezliği ortaya çıkabilir. Enfekte çocuklarda mental, fiziksel ve seksüel yönden gelişme geriliği görülebilir (61-63). Sedimentasyon genellikle artmış, kan proteinleri bazen normal, bazen azalmış olabilir (60). A.duodenale'ye bağlı ortalama günlük kan kaybı

N.americanus'a göre 7-8 kat daha fazladır (64). Tablo-I'de demir eksikliğinin nedenleri özetlenmiştir.

Tablo-I: Demir Eksikliği Anemisi Nedenleri

Demir ihtiyacında artış
Bebeklik veya ergenlik dönemindeki hızlı büyüme Gebelik Eritropoetin tedavisi
Demir kaybında artış
Kronik kan kaybı Menstrüasyon Akut kan kaybı Kan bağıışı Polisitemia vera tedavisi için flebotomi
Azalmış demir alımı veya emilimi
Yetersiz beslenme Malabsorbsiyon sendromu (Sprue, Crohn Hastalığı) Cerrahi sonrası malabsorbsiyon (Postgastrektomi) Akut veya kronik inflamasyon

DEA tanısı konulduğunda etyolojiye yönelik incelemeler yapılmalıdır. Kolon ve uterus maligniteleri başta olmak üzere özellikle tedaviye yanıtıslığı olan bireylerde çölyak hastalığı akla getirilmelidir (65). Her hastalıkta olduğu gibi tanıya giden yolda öncelik anamnezdedir, kadınlarda öyküde mens süreci, gebelik, doğum ve laktasyon süreçleri ayrıntılı araştırılmalı her iki cinste ise gizli veya aşıkâr kanama nedeni olabilecek peptik ülser hastalığı, Helicobacter pilori öyküsü, ailede kanamaya yatkınlık yaratabilecek durumların varlığı, ailede sindirim sistemine ait öykü, kan bağıışında bulunma gibi nedenler ayrıntılı olarak sorgulanmalıdır (66).

2.1.4. Demir Eksikliğinde Laboratuvar Bulgular

DEA'den şüphelenildiğinde tanıyı kesinleştirmek için basit laboratuvar testleri çoğu zaman yeterlidir. Tam kan, serum demiri, total demir bağlama kapasitesi (transferrin, TIBC) ve ferritin tayini tanı için yeterli ve maliyet/etkin bulunmuştur (67). Tablo-II'de demir eksikliğinde laboratuvar değerleri verilmiştir (68).

Tablo-II:Demir eksikliğinde laboratuvar incelemeleri

	Demir depolarının azalması	Demir eksikliği eritropoezi	Demir eksikliği Anemisi
Hemoglobin	Normal	Hafif azalma	Hafif azalma
Demir depoları (mg)	<100	0	0
Serum demiri (µg/dL)	Normal	<60	<40
Satürasyon (%)	20-30	<15	<10
Ferritin (µg/L)	<40	<20	<15
Sideroblastlar (%)	40-60	<10	<10
Eritrosit protoporfirini (µg/dL eritrosit)	30	>100	>200

Eritrosit morfolojisi ve indeksler: DEA’inde beklenen klasik tablo hipokrom mikrositer anemiyken bu durum demir eksikliği anemisi için spesifik değildir (69). Özellikle demir verilmesinin zaten demir açısından yüklü olduğu talasemi ve kronik inflamasyon durumlarında tabloyu daha da ağırlaştırabileceği düşünüldüğünde ayırıcı tanıda dikkatli olunmalıdır. RDW (Red cell Distrubition Width- Eritrosit dağılım genişliği) anizositozun (eritrosit boyutlarındaki farklılıklar) matematiksel olarak ifade edilmiş şeklidir ve bütün otomatik kan sayım cihazları bu parametreyi vermektedir. RDW normal değeri 13 ± 1 dir. DEA’nde RDW artmıştır ve genellikle 15 ’ten fazladır (68).

Retikülosit indeksleri: Günümüzde retikülosit sayımının otomatik cihazlarla yapılması klinisyenlere retikülosit hacmi, retikülosit hemoglobin içeriği ve retikülosit hemoglobin konsantrasyonu gibi farklı retikülosit parametrelerini değerlendirme olanağı sunar (70). 210 çocuğun alındığı bir çalışmada retikülosit hemoglobin içeriği değerlendirilmiş ve <26 pg/retikülosit değeri demir eksikliğini öngörmeye serum demiri, ferritin, transferin ve transferin satürasyonu gibi parametrelere üstün bulunmuştur (71). Eritropetinle tedavi edilen 32 hemodiyaliz hastasının değerlendirildiği bir başka çalışmada <26 pg/retikülosit değeri demir eksikliğini saptamakta 100 sensitivite ve 80 spesifite ile serum ferritin ve transferin satürasyonu gibi parametrelere üstün bulunmuştur (72).

Serum demiri ve transferin düzeyleri: DEA’de serum demir düzeyi düşerken, transferin

(total demir bağlama kapasitesi) artar (73). Düşük serum demir ve yüksek transferin düzeyi, normal bireylerde %25-45 arasında olan transferin saturasyonu (Serum demiri/transferrinx100) değerinde düşme ile sonuçlanır, bu oran sıklıkla %10'dan azdır (74, 75).

Ferritin düzeyi: Eşlik eden hastalığı olmayan bireylerde depo demir için en iyi ve en kolay gösterge olarak ferritin kullanılmaktadır (76, 77). Serum ferritin düzeyi vücut demir depoları ile koreledir, bu yüzden demir depolarını tahmin etmek için en uygun laboratuvar testidir. Ferritin için normal değerler, bireyin yaşı ve cinsiyetine göre değişir. Ortalama serum ferritin değerleri yetişkin kadında 30 g/L, yetişkin erkekde 100 g/L dir. Serum ferritin düzeyinin <15 g/L olması demir depolarının tükendiğini gösterir (78). Ferritin birçok infeksiyon, malign ve inflamatuvar hastalıklarda bir akut faz reaktanı olarak artmış miktarlarda sentezlenir (68). Serum ferritin değerinin belirgin şekilde düşük olduğu demir eksikliği dışında bir klinik durum tanımlanmamıştır (79). Serum ferritin düzeyinin 15 ng/mL'den daha düşük olduğu durumlarda %58 duyarlılık ve %99 özgüllük ile DEA'ni göstermektedir (80). Eşlik eden infeksiyon veya inflamatuvar hastalığı olmayan anemik bir hastada ferritin düzeyi 30 ng/mL alındığında duyarlılık %92 iken, özgüllük %98'dir. Ferritin düzeyi 40 ng/mL alındığında ise duyarlılık ve özgüllük %98'dir (81, 82). Ferritin düzeyi demir eksikliği olmadan serum transferin düzeyinin artmış olduğu gebelerde demir eksikliği tanısı için yararlıdır (67). Gebe hastaların alındığı bir çalışmada azalmış depo demirini göstermede kriterler tek tek değerlendirildiğinde % 90 duyarlılık ve %85 özgüllük ile en iyi gösterge olarak bildirilmiştir (83). Değerlendirme yapılırken gebelik ve oral kontraseptiflerin kullanımı ile plazma transferin değerlerinde artış olabileceği, KHA'nde ise hem demir düzeyinin hem de transferrin düzeyinin birlikte düşebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (67).

İnflamatuvar durumlar: KHA infeksiyon, inflamasyon, neoplastik hastalıklar, ağır travmalar, kalp yetersizliği, diabetes mellitus, akut veya kronik immun aktivasyon sırasında görülen anemidir. Anemi esas olarak normokrom normositerdir. KHA'nin günümüzde eritropoetinin sitokin aracılı bir yol ile bozulması ve demir homeostazi, eritroid proliferasyonu ve eritropoetin üretiminin değişken nitelikte etkilenmesi yolu ile geliştiğine inanılmaktadır. Etkili olduğu düşünülen sitokinler arasında IL-1 α , IL-1 β , IL-6, transforming growth factor β (TGF- β) ve tumor necrosis factor- α (TNF- α) yer alır. KHA'nin anahtar mekanizmasının demirin tercihen makrofajlarda sekestrasyonu ve böylece eritroid öncüllerin demire ulaşımının kısıtlanması olduğu düşünülmektedir. Demirin makrofajlardan salınımının bozulması demirin barsaktan Emilimi ve makrofajlardan geri dönüşümünden sorumlu olan ve karaciğerde üretilen bir peptid olan hepsidin aracılığıyla, demirin makrofaj ve enterositlerden salınımını

sağlayan bir membran molekülü olan ferroportinin ekspresyonunda azalma ile sonuçlanır. KHA'nde hepsidinin üretimindeki artışın aralarında IL-6'nın bulunduğu inflamatuvar sitokinler aracılığı ile olduğu ve transferrin reseptör 2 ve hemojuvelin gibi bir çok proteinin etkisinin bulunduğu düşünülmektedir (54). Bu durum plazma demir seviyesinde düşmeye (hipoferremi) ve yeni hemoglobin (Hb) sentezi için demir eksikliğine neden olmaktadır. Genellikle hafif bir anemi vardır (Hb 10–11 g/dl), ancak hastaların % 20 kadarında daha ağır (Hb $\leq$ 8 g/dl) bir anemi saptanabilir. Eritrositler normokrom normositerdir, hastalık uzadıkça hipokrom mikrositer eritrositler görülebilir. Mutlak retikülosit sayısı genellikle düşüktür ($< 25.000 \mu l$). Anemi ile beraber IL-6 gibi sitokinler ve fibrinojen, sedimantasyon, c-reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanlarında artma gözlenir. Serum demir ve transferrin düzeyleri düşüktür. Transferrin saturasyonu normaldir. Ancak KHA'li hastaların %20 sinde transferrin saturasyonu demir eksikliğinde görülen sınırlara yakın derecede (%10 kadar) düşük saptanabilir. KHA'ni DEA'nden ayırmak için transferrin reseptörü ve/veya özel eritrosit indeksleri kullanılabilir. Demir eksikliğinde hücre membranında transferrin reseptörü (TfR), serumda da sTfR artar. KHA'yı demir eksikliğinden ayırmak için bir diğer yol da hastaya demir tedavisi verip yanıtı gözlemektir. Ferritin indeksi (sTfR/log. ferritin) olarak hesaplanır. Bu indeks <1.0 ise KHA, >2.0 ise ya demir eksikliği ya da KHA+DEA düşünülmelidir (84). Ferritin plazma düzeyinin enfeksiyon, inflamasyon, karaciğer hastalıkları ve maligniteler gibi durumlarda yükseldiği bir akut faz reaktanıdır. IL-1 ve tümör nekroz faktör(TNF) gibi inflamatuvar sitokinler ile hepatositlerce sentez ve salınımı direkt olarak artmaktadır (77). Bu nedenle DEA'ne eşlik edebilecek inflamatuvar süreci bulunan hastalarda ferritin hatalı olarak normal sınırlarda değerlendirilebilir. İnflamasyonun serum ferritin düzeyini üç kat kadar artırdığı bilinmektedir (74). Romatoid artritli hastalarda yapılan bir çalışmada serum ferritin düzeyi <60 mg/mL bulunması hastaların %83 kadarında demir tedavisine yanıtı öngörmede anlamlı bulunmuştur (85). DEA ve KHA arasındaki farklar tablo III gösterilmiştir (86).

Tablo III: DEA ve kronik hastalık anemisi arasındaki farklar

	KHA	DEA
Demir	↓	↓
Transferin	↓ veya normal	↑
Transferin saturasyonu	↓	↓
Ferritin	Normal veya↑	↓
Serum transferin reseptörü	Normal	↑
Soluble transferin reseptör/log ferritin	<1	>2
Sitokin seviyesi	↑	Normal

Kemik iliği demir depolarının değerlendirilmesi: Kemik iliği aspirasyon veya biyopsisi retiküloendoteliyal sistem demir depoları hakkında bilgi verse de serum ferritin ölçümü büyük ölçüde depolama demir belirlenmesi için kemik iliği aspirasyonlarında yerini almıştır (Tablo-IV). Serum ferritin düzeyi demir yükünün değerlendirilmesi açısından kemik iliği incelemesinden daha iyi bir göstergesidir. Bununla birlikte demir depolarına ek olarak, kemik iliği incelemesi gelişmekte olan eritroblastlara demirin etkili bir şekilde sunumu hakkında bilgi verir. Normalde kemik iliği yayması yapıldığında gelişmekte olan eritroblastların %20-40'ının (sideroblast) sitoplazmasında ferritin granülleri görülür. Bu hemoglobin sentezi için gerekli olandan fazla demiri temsil eder. Demir depolarından demir serbestleşmesinin bloke olduğu durumlarda sideroblast az veya hiç saptanamayacaktır (78).

Tablo-IV: Demir depo ölçümleri

Demir depose	Kemik iliği deposu, 0-4+	Serum Ferritin, g/L
0	0	<15
1–300 mg	Trace to 1+	15–30
300–800 mg	2+	30–60
800–1000 mg	3+	60–150
1–2 g	4+	>150
Demir yükü	—	>500–1000

2.2. SİTOKİNLER

2.2.1. Sitokinler ve immün sistemdeki rolleri

İmmün sistem doğuştan ve kazanılmış olmak üzere iki ana immün yanıt yönteminden oluşmakta olup, kazanılmış immün yanıt ise hücresel ve humoral immünite alt dallarına ayrılmaktadır. Kazanılmış immünite, tehditlere karşı yanıtta daha yavaştır. Ancak doğal immünitede olmayan iki özelliğe sahiptir; spesifik bir antijeni tanıma ve ileriki karşılaşmalarda daha hızlı cevaba yol açan hafıza. Kazanılmış immünite iki ana kolda incelenir;

- Humoral immünite: B lenfositler ve plazma hücreleri tarafından üretilen antikorlara dayanır.
- Hücresel immünite: T helper ve sitotoksik T lenfositlerin çeşitli hedef hücrelerle etkileşimine dayanır.

İmmün hücreler hem birbirleriyle iletişimlerini sağlayan, hem de patojenlere karşı saldırılarını sağlayan çeşitli ürünler üretirler (87). Sitokinler aşağıdaki özelliklere sahip olan potent glikoprotein mediatörlerdir;

- Hücreler arasında sinyal görevi görüp immün yanıtı koordine ederler.
- Hücreler tarafından ya bölgesel alana ya da kan dolaşımına bırakılırlar.
- Yüksek affiniteli hücre reseptörlerine bağlanırlar.
- Aynı zaman immün sistemde olmayan hücreler tarafından da salgılanırlar (fibroblastlar, endotelial hücreler).

Sitokin etkileşimleri: Hücreler birbirleriyle direk temas veya mediatörleri ile birbirleriyle iletişim kurabilirler. Hücrelerin direk teması karşı hücrenin immün fonksiyonunu TNF- α gibi membrana bağlı sitokinler vb. bir çok mekanizma ile regüle edebilir. Buna karşın, mediatörlerin salınımı aynı dokuda daha uzaktaki hücelere etki edebilir. Bazı durumlarda ise sitokin kana karışıp başka organlara ulaşabilir. Örneğin lokal bir inflamasyon alanından salınan IL-6 karaciğerde akut faz proteinlerinin üretimini arttırabilir (88). Suda çözünabilir sitokinler hedef hücredeki yüzey reseptörüne bağlanır ve hücre fonksiyonunu değiştirir.

2.2.2. Normal İmmünitede Sitokinler:

Sitokinlerin normal immünitedeki rollerini kısaca özetlemek gerekirse antijen sunumu, T hücrelerinden salınma, T hücrelerine etki ve regülasyon, amplifikasyon etkisi, hücresel migrasyon, negatif feedback rollerinin olduğu kadar immün sistem dışında da etkinlikleri mevcuttur.

Antijen sunumu: Antijen sunumu antijen sunan hücrelerin (APC) antijeni tanıyıp onu işlemesiyle başlar. En potent APC makrofajlar ve dendritik hücrelerdir. Ancak B lenfositler ve langerhans hücreleri gibi çeşitli başka hücrelerde değişik kapasitelerle bu işi yapabilirler. Antijenin işlenmesi, internalizasyon, küçük polipeptidlere degradasyon ve sonrasında peptidin hücre yüzeyinde human leukocyte antigen(HLA)-DR gibi majör histokompatibilite proteinlerine bağlı olarak reekspresyonundan oluşan bir dizi olayın karmaşık sistemiyle oluşur. Sonrasında antijen T lenfositlere sunulabilir. Bu T lenfositler spesifik bir antijene karşı uygun T lenfositlerin reseptörlerine sahiptirler. T lenfositler-APC kompleksi belli sayıda yardımcı molekül (CD4 veya CD8, CD3, ICAM-1) ve kostimülatör proteinler (B7 ve CD28, ICOS, PD-1) içerir. Bu moleüller iki hücre arasındaki etkileşimleri stabilize eder ve T hücrelerin aktivasyonunu veya supresyonunu sağlarlar (89).

T lenfosit alt gruplarına sitokinlerin etkisi: Sonuçta oluşacak sitokinlerin profili antijen tipine, lokal sitokin durumuna ve spesifik T lenfositlerin prevalansına bağlıdır. Belirli sitokinleri üreten belirli T lenfosit alt grupları (özellikle farelerde) tanımlanmıştır. Bu alt gruplar immünitinin çeşitli yönlerini modüle ederler (90, 91).

Th1: T helper (Th)-1 hücreleri interferon (IFN)- γ ve IL-2 üretirler, IL4 üretmezler. Th1 hücreleri gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarını regüle ederler. Th1 cevabı lokal IL-27, IL-23 ve IL-12'yi içeren IL-12 sitokin süper ailesinin salınımı sayesinde tetiklenir. IL-12 IFN- γ salınımını sağlarken IL-23 IL-17 salınımını sağlar. Bu yanıtlar makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilen IL-15 ve IL-18 ile arttırılır (92).

Th2: Th2 hücreler IL-4 ve IL-10 üretir, ama IL-2 veya IFN- γ üretmezler. Bunlar alerjik ve antikor yanıtları düzenlerler. Th2 yanıtı lokal IL-4, IL-33 ve IL-18'in sinerjik bir şekilde üretimiyle oluşur (93).

Th17: Bu hücreler IL-17A ve diğer bir çok sitokinler (IL-17F, IL-22, IL-26 gibi) ve kemokinler (CCL20) üretirler. Bu sitokinler IL-1 β , IL-6, IL-21, ve IL-23 varlığında uyarılırlar. Günümüze kadar A' dan F' ye IL-17'nin altı izoformu tanımlanmıştır. IL-17A ve IL-17F aktive Th17 hücrelerinde eksprese olurlar ve inflamatuvar süreçte artarlar (94). IL-3, GM-CSF ve TNF- α gibi bazı sitokinler çeşitli Th alt grupları tarafından üretilirler (90).

Regülatör T hücreler: T regülatör (Treg) hücreleri supresif özelliklere sahip bir grup T lenfositlerdir. Bunlar TGF- β ve IL-10 salgırlar. Bu hücrelerin etki mekanizması genelde temas ile hücre supresyonudur. Romatoid artrit ve astım gibi hastalıklarda, anormal immün yanıtın kısmen nedeni Th1 veya Th2 aşırı aktiviteleri olabilir. Th17 hücrelerinin de çeşitli inflamatuvar hastalıklarda rolü olabilir, ancak bu hücrelerin insanlardaki hastalıklara katkısı halen araştırılmaktadır. Ortamdaki T lenfosit alt gruplarının predominansı, ortamdaki sitokin miktarından anlaşılır. Örnek olarak, IFN- γ veya IL-12 varlığı Th1 oluşumunu, IL-10 ve IL-4 Th2 dominansını belirler (95,96). İnsanlardaki T lenfositler alt gruplarla kısıtlı değildir ve başka bir çok sitokin kombinasyonu tanımlanmıştır (97). Ancak genelde Th1, Th2, Th17 ve TH0 hücrelerinin insan immün yanıtındaki rolleri, örneğin otoimmün hastalıklara yatkınlık veya çeşitli T ve B hücreli lenfomalarda tanımlanmıştır (98-100).

Sitokinlerin amplifikasyon etkileri: Predominan sitokinler immün yanıtı pozitif feedback halkalarıyla arttırırlar. Bunların etkileri, inflamatuvar hücreleri seferber etme, hücre migrasyonunu inhibe etme, T lenfosit proliferasyonunu arttırma, antijen ekspresyonunu arttırma, T veya B lenfosit stimülasyonunu sağlamak olarak sayılabilir. Genel olarak Th1 yanıtı tüberkülozda granülom oluşumu gibi lokal hücresele immün yanıtı yol açar (101). Anahtar efektör sitokin ise IFN- γ 'dır, ki geniş çapta lökosit aktivasyonunu ve organizasyonu sitotoksik ve fagositik özelliklerini arttırarak sağlar. Buna karşın, Th2 hücreleri humoral immünite ve antikor oluşumunu tetikler. Bu antiviral yanıtta ve hızlı diseminasyon olan bakteriler ve parazitlere karşı savunmada, veya mukozal immünitede parazitlere karşı savaşta önemlidir. Th2 yanıtında, IL-4 majör T lenfosit mitojeni olarak rol oynar ve Th1 hücrelerini baskılar (102). IL-4' e hücre reseptörlerinde ortak bir alfa subünit bulunmasıyla çok benzeyen IL-13 diğer Th2 hücrelerini stimüle edebilir (103). IFN- γ üretimi minimaldir ve makrofaj ve Th2 tarafından salınan IL-10 Th1 aktivasyonunu suprese eder. Aktive CD4⁺ T hücreleri B lenfositlerle direk olarak veya çözünebilir mediatörler olan IL-2 veya IL-4 ile etkileşirler ve plazma hücrelerine dönüşmelerini ve antikor üretmelerini sağlarlar. Th2 aracılı olaylarda IgE

ve IgG alt grupları baskın immünglobulinlerdir(104). Th17 hücrelerinin konak savunmasındaki rolleri halen kesin değildir, ancak bazı enfeksiyöz durumlarda rolleri olduğu düşünülmektedir (105). Bu hücreler ekstrasellüler mantar ve bakteriyel enfeksiyonlarında rol alabilirler.

Hücrel migrasyon: IL-8 ve monosit chemoattractant protein-1 (MCP-1) gibi faktörler spesifik yüzey reseptörlerine bağlanarak hücrelerin dokuya migrasyonunu sağlarlar (106). 40'a varan kemokin bugüne kadar tanımlanmış olup, rolleri sadece migrasyonu sağlamak olmayıp, aynı zamanda hücre aktivasyonu ve sağkalımını sağlarlar.

Negatif feedback - Sitokinler tarafından sağlanan pozitif feedback mekanizmaları dışında immün sistemde bir çok negatif feedback mekanizmaları da vardır.

- Makrofajlar tarafından salgılanan prostoglandinler (PGE₂ gibi), makrofajlarda HLA-DR indüksiyonu veya T lenfositler tarafından IFN- γ üretimi gibi bir çok fonksiyonu baskılayabilirler (107).
- Transforming growth factor-beta (TGF- β) potent bir T lenfosit aktivasyonu inhibitörüdür ve T lenfosit proliferasyonu ve sitokin üretimini baskılar (108). Bu aynı zamanda IL-1 reseptörlerinin sayısını azaltarak diğer sitokinlere karşı duyarlılığı azaltır.
- IL-10 makrofajları deaktive eder ve sonuçta T lenfosit tarafından sitokin üretimini azaltır (109).
- IL-35 Th17 hücre amplifikasyonunu inhibe eder (110).

Bu kontrol mekanizmaları inflamatuvar yanıtın dengede olmasını sağlayan kritik yollardır. Bunların önemi, bazı mekanizmalardan mahrum bırakılan hayvan modellerinde anlaşılmaktadır. Örneğin, TGF- β geni olmayan bazı farelerde yaygın inflamatuvar hastalıklar görülmektedir, nedeni ise bu molekülün immünsupresif etkisinin ortadan kalkmasıdır (111). Bu gözlem, sitokinlerin immün yanıtı başlatma özelliği dışında, bitirme özelliği olduğunu göstermektedir.

İmmün sistem dışı etkileri - Sitokinlerin IL-6 aracılığıyla yağ dokuya veya hipotalamik fonksiyonlara etkisinin olabildiği gösterilmiştir (112).

2.3. İMMÜNOGLOBULİNLER

2.3.1. İmmünoglobulinlerin Yapısı

İmmünoglobulinler (Ig), hücreler tarafından antijen moleküllerinin çeşitli hücrel ve humoral efektör mekanizmalarla etkileşimlerini sağlayan çok işlevli moleküllerdir. Bu efektör mekanizmalar bu sistemlerin aktivasyonunu içerir; B lenfosit sitoplazmasında sinyal iletim aracı (yüzeyel Ig reseptörleri varlığı durumunda), IgG'nin sabit bölge reseptörleri, ve

kompleman sistemi. Ig' ler aynı zamanda antijen prezentasyonu yaparak ve immün hücreler üzerindeki regülatör reseptörlerle etkileşerek immün sistemin afferent yolunda rol oynarlar (113).

İmmunoglobulinler 4 ayrı polipeptid içerirler; 2 benzer hafif (L) zinciri, 23 kilodalton molekül ağırlığında ve 2 benzer ağır (H) zinciri, 55 kilodalton molekül ağırlığındadır. Her bir alt birim Ig domainlerden oluşur (114). L zinciri 2 domaine H zinciri 4 veya 5 domaine sahiptir. Domain yapıları ve 4 zincir yapının tamamı kendi içlerinde ve birbirleri arasında kovalent ve nonkovalent bağlarla bağlıdır. L zincirinin değişken bölgesi (variable region, VL) bu proteinin N amino terminali yarısıdır ve V kapa ile V lambda genleri tarafından kodlanır. L zinciri bağlanma bölgesi (joining region, JL) proteinin C (karboksi) terminalinin küçük bir kısmıdır ve J kappa ile J lambda genleri tarafından kodlanır. L zincirinin sabit bölgesi (constant region, CL) C terminalinin yarı kısmıdır ve C kappa veya C lambda geni tarafından kodlanır. Benzer şekilde H zincirinin değişken kısmı (VH) molekülün amino terminali kısmıdır. VH' nin C terminalinde D (diversity, çeşitlilik) bölgesi bulunur ve bunu H zinciri bağlanma (joining region, JH) bölgesi takip eder. H zincirinin sabit bölgesi (CH) çok daha büyüktür. VH, VL ve CL bölgeleri hepsi sadece bir domain'den oluşurken, CH 3 veya 4 domainden oluşur. CH bölgesi domainleri, VH'ye en yakın olan CH1 ve C terminaline en yakın olan CH3 ve 4 şeklinde numaralanır. Eğer Ig B hücrelerde integral membran proteini olarak üretilmişse son CH bölgesini hidrofobik bir transmembran sekansı takip eder ve bu yapı Ig'yi membrana yerleştirir. Bu sekans salgılanan Ig'lerde bulunmaz (115).

Birleşme bölgesi: H ve L zincirlerinin variable bölgeleri antikorun birleşme yerini oluşturur ve buraya antijenler bağlanır. Dolayısıyla her bir 4 zincir Ig molekülü iki birleşme bölgesine sahiptir, buna bivalent denir. H ve L zincirlerinin variable bölgelerinde, aminoasitlerin çok çeşitlendiği belirli sekanslar bulunur. Bunlara hypervariable (çok değişken) bölgeler denir. Bunlar arasında daha az değişken bölgeler bulunur. Hypervariable bölgeler tersier protein yapısında dış yerleşimli olarak bulunurlar ve antijenlere temasa geçen bölgeler olarak görev alırlar. Bu nedenle bu bölgelere complementarity determining regions (CDR) denir (116).

Eklem bölgesi: Bu bölge belirli Ig klaslarında (IgG, IgA ve IgD) CH1 ve CH2 bölgeleri arasında yer alır. Bu bölge standart CH domaininden daha esnektir. Bu bölge bir IgG molekülünün antijenin iki bölgesine aynı anda bağlanmasını sağlar. IgM ve IgE' nin eklem bölgeleri CH2' nin C terminalinde bulunur (113).

Karbonhidrat: Antikor moleküllerinin sekanslarında bir çok glikozilasyon bölgesi bulunur. Bu alanlar daha çok H zincirinde gözlenir. Sakkaridler Ig'leri daha çözünebilir hale getirir ve enzimatik degradasyondan korur. Şekerler aynı zamanda Ig'lerin Ig reseptörleri, bağlanma

faktörleri ve kompleman sistemleri gibi diğer serum proteinleriyle etkileşimlerinde rol alırlar (117). H zinciri oligosakkaridlerindeki sialik asidin IgG2nin önemli antiinflamatuvar mekanizmalarında önemli rolü vardır. Yüksek sialik asit miktarına sahip Ig'lerin FC reseptörüne karşı afiniteleri düşüktür, ancak hipotetik bir regülatör makrofaj grubuyla etkileşime geçip immüniteyi baskıladığı düşünülmektedir (118).

2.3.2. İmmünoglobulin Alt Grupları:

Antikorların H ve L klasları ve subklasları majör yapısal farklılıklarıyla (örneğin, H zincir domainlerinin 4 veya 5 olması, 4 zincir ünitelerinin kovalent birleşip dimerler veya pentamerler oluşturmaları) veya primer amino asit sekanslarıyla ayırt edilir. 2 L zincir klası vardır, kappa ve lambda. H zincirinin 5 majör klası bulunmaktadır, bunlar; mü, delta, gama, alfa ve epsilondur. Bunlar immunoglobulinler 5 majör alt grubuna tekabül eder; IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE. IgG, IgA ve IgD üç sabit bölge domainine sahipken, IgM ve IgE bu sayı dördttür (119).

IgG: Serumda en çok bulunan immunoglobulindir ve bir erişkinde tüm Ig'lerin yüzde 75'ini oluşturur. Serum konsantrasyonu 500 ve 1500mg/dl arasındadır. IgG monomiktir (H2L2) ve moleküler ağırlığı 150kd'dur. IgG aynı zamanda bolluğundan ve moleköl yapısının görece küçük olmasından dolayı iç organlarda ve dokularda da bulunur. Kandaki yarı ömrü yaklaşık 23 gündür (120).

IgM: B lenfosit membranındayken monomer yapıda olup, salındığı zaman ise 950kd ağırlığında olan pentamer yapıdadır. Pentamerik IgM disülfid bağlar ile birbirine bağlıdır ve ayrıca J zinciri denilen ayrı bir moleköl içerir. IgM'nin serum konsantrasyonu yaklaşık 40-400mg/dl arasındadır. Dolaşımdaki yarı ömrü 5 gündür. Büyük boyutlarından dolayı çoğunlukla dolaşımda bulunurlar (121).

IgA: Serum konsantrasyonu yaklaşık 50-350mg/dl civarındadır, ancak vücut salgılarındaki baskın IgA alt gurubudur. IgA çoğunlukla 160 kd ağırlığında monomer ve dimerler şeklinde bulunur. Dimer yapıda IgM'deki J zincirinin aynısı bulunur. Dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 6 gündür. Mukozadaki B hücreleri tarafından salgılanan IgA , epitelyal hücrelerin bazolateral yüzeylerinden poli-IgR kompleksi şeklinde içeri alınır ve bir grup proteoliz işlemlerinden sonra apikal yüzeye SIga olarak salgılanır. Bazı pentamerik IgM'lerde benzer şekilde salgılanır (122).

IgD: Serumda düşük miktarlarda bulunur (<10mg/dl). Ancak IgM ile birlikte IgD B hücre yüzeyindeki majör reseptörlerdir ve B hücre aktivasyonunda önemli role sahiptir. IgD 170kd moleköl ağırlığına ve 3 günlük yarı ömre sahiptir (123).

IgE: Sağlıklı bir insanda en düşük konsantrasyona sahiptir. IgE 190 kd ağırlık ile 3 gün gibi kısa bir yarı ömre sahiptir. Parazitlere karşı immünitede ve alerjik reaksiyonlarda önemli role sahiptir (124).

2.4. KOMPLEMAN SİSTEMİ

Kompleman sistemi doğal immün sistem için çok sayıda koruyucu fonksiyon sağlar. Kompleman sistemi 30'u aşkın çok çeşitli membran ve serum proteininden oluşmaktadır. Bakteriyel hücre duvarlarında membran atak kompleksini depolayarak kan sterilitesini sağlamakta ve sonra da onları lizise uğratmaktadır (125). Ayrıca fagositlerin yok edilmesinde çalışan patojenlerin opsonizasyonuna da katılmaktadır. Kompleman aktivasyonu sırasında üretilen peptid anafilotoksinler mikrobisidal etkilerle görülen inflamatuvar yanıtların da gelişmesini sağlar. Komplemanların immün komplekslerin üzerinde depolanması bunların çözülebilir tutulmasında ve dolaşımdan atılmasında kolaylık sağlamaktadır.

Ayrıca komplemanın kazanılmış immün yanıtı şekillendirdiğine dair kanıtlar çoğalmaktadır. Kompleman proteinleriyle birlikte yapılan antijenler B hücreleri ve diğer antijen sunan hücreler tarafından tutulur ve bu da T-hücresi aktivasyonu ile sonuçlanır. Çeşitli kompleman proteinleri eksik olan fareler üzerinde yapılan çalışmalar B hücreleri tarafından optimal antikor üretimi için gerekli olduklarını göstermiştir(126). Son olarak erken kompleman bileşikleri olmayan insanlar ve deney hayvanlarının özellikle sistemik lupus eritematozus (SLE) olmak üzere otoimmün hastalıklara yatkın oldukları bilinmektedir. Bu gözlem; komplemanın çözülebilir kendinden antijenleri tanımlamak ve kendinden reaktif B hücrelerini yok etmek için bir şekilde gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Kompleman sistemi immün komplekslere maruz kalma durumunda hemen aktive olmaktadır ancak kendinden olan ve kendinden olmayan arasındaki ayrımı yapan klonotipik reseptörleri olan T ve B hücrelerinin immünolojik bellekleri bulunmamaktadır. Aktive edilen kompleman konak ve patojen yüzeylerinde depolanabilir. Potansiyel olarak tehlikeli olan bu durum kompleman aktivasyonunun düzenleyicileri (RCA) olarak ifade edilen bir dizi genetik yapısal ve işlevsel olarak benzer proteinler tarafından kontrol edilir. Bu proteinler konak dokuları üzerindeki kompleman aktivasyonunun türe özgü şekilde aşağıya çekilip düzenlenmesini sağlarlar (125, 127).

Kompleman aktivasyonu: Doğal immün sistemin temel komponenti olarak kompleman henüz kontrol altına alınmış aktivasyon yollarıyla gereğinden fazla durumdadır. Aktivasyon sürecinde meydana gelen vakalar sadece komplemanla bağlantılı hastalık konumlarının patolojisinden sorumlu değil aynı zamanda inhibitörlerle de ilişkilidir (125).

Klasik Yol: Geleneksel olarak, sadece IgM veya IgG içeren immün komplekslerle aktive edildiği düşünülse de, klasik yolun diğer immün komplekslerden başka hedeflerce de aktive edilebildiği ortaya konmuştur. Apoptotik hücreler dikkate değer biçimde C1q'ya bağlanır ve C1 proteazı aktive eder. C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid proteini kromatin ve apoptotik hücrelerce salınan diğer ribonukleoprotein komplekslerine bağlanır. CRP/nükleer antijen kompleksleri C1'e bağlanır ve onu aktive eder. C1q ve klasik yol, çoğunlukla otoantijen içeren nükleer materyalin opsonizasyon ve çıkarılmasında önemli bir yol oynar (125). Klasik yol aktivasyonunun düzenlenmesi çeşitli şekillerde olabilir. Klasik yol aktivasyonu RCA proteinleri tarafından da düzenlenebilmektedir. Bu proteinler, kompleman sisteminin kendisini diğer hedeflerden ayırma yeteneğinde önemlidir. RCA proteinleri, C4 bağlı protein (C4-bp) ve kompleman reseptör 1 (CR1) klasik yol düzenlenmesine özelleşmişlerdir (128).

Alternatif Yol: Alternatif yol C3'ün sıvı fazında spontan olarak düşük seviye aktivasyonundan geçmesi avantajını kullanır. C3'ün glomerüler filtrasyonu ve sabit durumdaki serum konsantrasyonu üzerindeki tahminlere dayanarak serum C3'ün %1- 2'sinin her saatte serum içinde aktive olduğu tahmin edilmektedir. Bu da C3'ün mantar ve bakterilerin polisakkaritlerine ve endotoksin ve virüslerle infekte olmuş diğer hedeflere kovalent bağlanmasına izin verir. Yüzeye bağlandığında C3 Bsb'ye benzer bir şekil alır ve C3 konvertaz CSbBb alternatif yolunu oluşturmak için serin proteaz faktörü D tarafından ayrılan B faktörünü bağlar ve bu kompleksin ömrü kısadır. Fizyolojik kompleman aktivasyonu sırasında properdin (faktör B) tarafından stabilize edilir. Ayrıca otoantikör C3-nefritik faktörü tarafından da stabilize edilebilir. C3 tip I membranoproliferatif glomerülonefrit ile ilişkilidir. Alternatif yol C3 konvertazı RCA proteinleri faktörü H, DAF ve CR1 tarafından negatif şekilde düzenlenir (127).

Lektin Yolu: En son gerçekleşen kompleman aktivasyonu ve aktivasyon yolu lektin yoludur. Protein-mannoz bağlayan lektin (MBL) pulmoner surfaktanlar A (SP-A) ve D'yi (SP-D) içeren kollektin ailesinin bir üyesidir. MBL'nin C1q'ya benzer bir yapısı vardır ve her biri globüler tanıma bölgesi ile serin proteazlarıyla etkileşim halinde olan kollajene benzer parçalara sahip alt ünitelerden oluşmaktadır. MBL; globüler bölge patojenlerin yüzeyindeki tekrarlayan karbonhidratları (mannoz ve N-asetilglukozamin) bağlayan bir lektin globüler bölge görevi görür. Çok sayıda mikroorganizma gram-pozitif, gram-negatif bakteriler, mikobakteriler, mantar, parazitler ve HIV-1 de dahil olmak üzere virüsler MBL tarafından tanınmaktadır. Genel olarak memelilerin glikoproteinleri ve glikolipidleri MBL tarafından tanınmamaktadır. Dikkate değer bir istisna agalaktozil-IgG dir. Modifiye olmuş bu

immünoglobülinin seviyeleri romatoid artrit gibi inflamatuvar durumlarda artmakta böylelikle lektin yolunun aşırı aktivasyonu klinik olarak gerekli hale gelmektedir. MASP-1 ve MASP-2 gibi iki serin proteazı muhtemelen kollajene benzer bir bölge sayesinde MBL ile birleşmektedir. Resmen kanıtlanmamış olsa da bu durum C1r ve C1s'nin Cq ile ilişkisine benzemektedir. MASP-1 ve MASP-2' nin aktivasyonu C2 ve C4'ün ayrılmasına ve sonrasında klasik yol C3 konvertazının oluşmasına neden olmaktadır (125-128).

MBL geninin yapısal ve düzenleyici parçaları serum seviyelerinde geniş bireysel farklılıklara yol açmaktadır. Düşük seviyeler çocuklar ve yetişkinlerdeki tekrarlayan infeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir ve sistemik lupus eritematozunun geliştirilmesinde minör risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Daha çarpıcı bir başka durum da sistemik lupus eritematosuzdaki infeksiyonla düşük seviyelerdeki MBL ile olan ilişkidir (129).

2.5. DEMİR VE İMMÜNİTE

2.5.1. Demirin immünite üzerine etkileri

Demir immün hücreler için büyümeyi uyarıcı olarak ve sitokin aktivitesinde ve hücre aracılı immün efektör yollarına olan etkisinin anlaşılmasıyla günümüzde immünitenin devamlılığının sağlanmasında önem taşımaktadır (6-9). Demir eksikliği ve demir birikiminin T ve B lenfositlerin veya NK hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyonunu değiştirerek immüniteyi etkiledikleri gösterilmiştir (10-13). Sıçanlarda deneysel olarak demir aşırı yüklenmesinin T-helper ve T-supresör/sitotoksik oranını T supresör hücrelerinin artmasını sağlayarak değiştirdiği gösterilmiştir (10).

Günümüzde insanlarda en az iki tip T helper hücre alt grubunun olduğu ve bunların ayrı sitokinler salgılayarak değişik immün efektör hücreleri etkiledikleri ve aynı zamanda birbirleri ile etkileşim gösterdikleri bilinmektedir (93). Th-1 hücreleri IFN- γ , IL-2 ve TNF- α ve TNF- β üretirler. Bu sitokinler diğer immün hücrelerde büyüme uyarıcı etkilerinin olması dışında, dolaşımdaki monositler ve bölgesel makrofajlardan TNF- α , IL-1, IL-2 gibi proinflamatuvar sitokinler üretmelerine yol açarlar. Bunun aksine Th-2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 üreterek bir taraftan güçlü bir antikor cevabın oluşmasını sağlarken diğer taraftan çeşitli makrofaj fonksiyonlarını inhibe ederek anti-inflamatuvar aktiviteye yol açarlar (130). Hücrel demir Th-1 ve Th-2 alt gruplarının diferansiyasyonu ve proliferasyonunu ayarlar ve bunu da kısmen hücrelerin transferin aracılı demir alımına farklı düzeylerdeki bağımlılığıyla sağlar (131, 132). Th-1 klonları antitransferrin reseptör (TfR) antikorları ile tedaviye çok duyarlıyken ve bu tedaviyle DNA sentezleri inhibe olurken, Th-2 hücreler bu prosedüre dirençlidirler. Bu kısmen Th2' lerin daha fazla şelate edilebilen demir depolarına

sahip olmalarındandır (131). Bu nedenle Th1'lerin immün efektör fonksiyonları *invivo* demir homeostazına daha duyarlıdır.

Monosit/makrofajlar ise demir sağlamak amacıyla çeşitli yollara sahiptirler. Bunlar; transferin bağımlı demir uptake, transmembran ferröz veya ferrik demir uptake, laktoferrin reseptör aracılı, ferritin reseptörleri veya eritrofagositoz yoluyla. Bu nedenle bunların proliferasyon ve diferansiyasyonu, sadece bir yolağın kısıtlanmasından etkilenmez (133, 134). Dahası demirin kendisi, nötrofil ve makrofajlarda çok toksik özellikleri olan hidroksillerin oluşumunda önemli katalitik komponent olarak rol alarak sitotoksik immün savunmada direk rol alır (135).

Demirin lenfosit proliferasyonunu etkilediği gibi immün hücreler de salgıladıkları sitokin ve radikaller ile transkripsiyonel/posttranskripsiyonel mekanizmalarla demir homeostazını regüle edebilirler. Demir homeostazının posttranskripsiyonel/translasyonel seviyede demire yanıt elementleri (IRE) ile etkileşimi aracılığı ile sağlandığı bilinmektedir. IRE'ler mRNA'nın demir depolama proteinlerini (Ferritin hafif ve ağır zincir) ve demir tüketim proteinlerini (hem biyosentezinde anahtar enzim olan eritroid aminolevulinik asit sentetaz (e-ALAS) kodlayan alanın 5' translasyon olmayan bölgesinde tanımlanmışken, majör demir uptake proteini olan TfR'yi kodlayan mRNA'nın 3' translasyon olmayan bölgesinde 5 adet IRE tanımlanmıştır (136, 137). Hücrelerdeki demir eksikliği demir düzenleyici protein (IRP)'lerin IRE'lere bağlanma affinitesini arttırıp, translasyon inisiyasyon kompleksi oluşumunu etkileyerek ferritin ve e-ALAS ekspresyonunu bloke eder (138). Tam tersine IRP'lerin TfR mRNA'sının 3' translasyon olmayan ucundaki IRE'lere bağlanmasıyla, TfR mRNA yarı ömrünü arttırarak bu proteinin ekspresyonunu arttırırlar (139, 140). Demir birikimi ise IRP'lerin IRE'lere affinitesini azaltır ve böylece ferritin ve e-ALAS'ın translasyonu azalır ve TfR mRNA'nın degrade olmasını sağlar. Bu da sonuçta TfR aracılı demir uptake'ini kısıtlarken demir depolanması (ferritin sentezi) veya hem sentezi ile demir tüketimini arttırır (136, 137).

2.5.2. Sitokinler aracılığıyla demir homeostazının regülasyonu

Th-1 ve Th-2 hücreleri sitokinlerinin demir homeostazını IRP/IRE ağının regülasyonunu etkileyerek ve bunun yanında IRP'den bağımsız yollarla kritik demir genlerinin ekspresyonunu değiştirip uyarak etkiledikleri gösterilmiştir. Proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1, tam olarak açıklığa kavuşmamış transkripsiyonel mekanizmalarla ferritin transkripsiyonunun potent uyarıcılarıdır (141, 142). Ferritin hafif ve ağır zincirleri çeşitli varyasyonlarının bileşiminden oluşan ve demir deposuna gereksinime göre değişiklik gösteren 24 subünitli bir proteindir (143). Sitokinler daha çok H-ferritin

sentezini etkilerken, L-ferritin immün regülasyona pek duyarlı değildir (144). Bundan ayrı olarak IL-1 ve IL-6 ferritin translasyonunu ferritin mRNA'sının 5' translasyon olmayan ucunda yer alan ve 'akut faz box' olarak adlandırılan bir bölgeyle etkileşerek uyarırlar (145). Bu proinflatuar sitokinler TfR aracılı demir uptake'ini azaltsalar da, in vivo şartlarda uygulanmaları hipoferremi'ye yol açtığı gösterilmiştir (146). Alternatif olarak bu sitokinlerin retiküloendotelial hücrelerden demir atılımını inhibe ettikleri düşünülmektedir. Bu işlem transmembran protein olan ferroportin veya demir düzenleyici taşıyıcı (IREG-1) yoluyla olabilir (147-149). Ferroportin-1 enterositlerden dolaşıma demir geçişini sağlamaktan sorumludur ve muhtemelen makrofajlarda da benzer işlevi göstermektedir. Bu proteinin işlevinin kısıtlanması retiküloendotelial hücrelerden demir çıkışını engelleyebilir ve hipoferremiye neden olabilir.

Th-1 aracılı majör düzenleyici sitokin olan IFN- 'nın demir homeostazına belirgin etkileri vardır. IFN-  ferritin transkripsiyonunu arttırmasına rağmen H-ferritin translasyonunu azaltır ki bu sitokin aracılıyla IRP bağlanması uyarılması nedeniyle olabilmektedir. IRP-1 bağlanma afinitesinin aktivasyonu IFN-  tarafından NO oluşumunun uyarılması nedeniyle olabilir (150, 151). Ayrıca IFN-  monosit ve makrofajlarda oksijen radikallerinin oluşumunu uyarır ve bununda IRP-1 aktivitesini değişik bir şekilde modüle ettiği gösterilmiştir (152, 153). Bu nedenle IFN-  aracılığıyla oluşmuş oksijen radikalleri ve nitrik oksit, IRP-1'in ferritine bağlanması uyarırlar ki bu da ferritin translasyonunu down-regule eder (150, 152). Ancak IFN-  TfR ekspresyonunu down-regüle ederek transferin aracılı demir uptake'ini azaltır (154). Makrofajlardan metabolik olarak aktif demirin uzaklaşması, IFN-  aktivitesini azaltır ve dolayısıyla makrofajlardaki Th-1 aracılı immün efektör yollarına negatif etki eder (9-11). T hücrelerinde başka bir Th-1 aracılı sitokin olan IL-2, TfR ekspresyonunu transkripsiyonel ve postranskripsiyonel seviyede up-regüle eder ki bu da IL-2'nin T hücreler üzerindeki büyüme uyarıcı etkisini açıklar (155). İlginç bir şekilde anti-inflatuar özellikler taşıyan Th-2 aracılı sitokinler olan IL-4, IL-10 ve IL-13 aktive makrofajlarda IFN- 'nın demir homeostazına etkisinin tam tersini gösterirler. Makrofafların IFN-   ncesi IL-4 ve/veya IL-13 ile maruziyeti sonrası NO oluşumunu ve devamındaki IRP aktivasyonunu baskılar ve sonuçta ferritin translasyonunu arttırır. Tersine TfR mRNA seviyeleri yükselir. Bu IL-4 ve IL-13'  n IFN- 'nın inhibitör sinyallerini antagonize etmeleri nedeniyle olabilir (156). Bu nedenle Th-2 aracılı sitokinler aktive makrofajlarda TfR aracılı demir uptake'ini dolayısıyla ferritine demir bağlanmasını arttırır ve proinflatuar sitokinler olan TNF, IL-1 ve IL-6'nın kronik inflamatuvar süreçlerde neden olduğu hipoferremi

oluşumuna yardımcı olur. Hipoferremi/hiperferritineminin uyarılması KHA'nin patogenezinde önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (157).

2.5.3. İmmün fonksiyonun demir ile regülasyonu

Sitokinlerin demir homeostazı üzerindeki etkilerinin yanında, demir sitokin aktivitesini ve makrofajların hücre aracılı immün mekanizmalarını etkiler ve dolayısıyla patojenlere yanıtı değiştirir (11, 158). Bu mekanizmalardan biri demirin IFN- γ üzerindeki direk inhibitör etkisidir. Makrofajlardaki demir miktarının artışı hücredeki IFN- γ aracılı mekanizmaların inhibisyonuna neden olur. Bunlar; proimflamatuar bir sitokin olan TNF- α ekspresyonu, MHC klas II antijenlerinin ekspresyonu, hücresel immünitinin in vivo ve invitro değerlendirilmesinde kullanılan bir parametre olan guanozin trifosfatın (GTP) yıkım ürünü neopterin oluşumu ve son olarak ICAM-1 ekspresyonudur (158, 159). Bunun sonucunda demir miktarı artmış makrofajlar IFN- γ aracılı yollarla hücre içi patojenleri öldürme kabiliyetlerini kaybederler. Bu patojenler, legionella, listeria, ehrlichia gibi bakteriler ve virüslerdir (11, 153). Bunun bir kısmı demir varlığında Nitrik oksit oluşumunun azalması nedeniyle olabilir. Bunun önemi ise Nitrik oksitin(NO) intrasellüler patojenler ve tümörler ile makrofajların savaşması için temel efektör molekül olmasıdır (160). Demir uyarılabilir NO sentazı (iNOS veya NOSII) inhibe eder ki bu enzim sitokinler tarafından uyarılabilen ve yüksek miktarda NO üretiminden sorumlu olan enzimdir (161). Demir IL-6 ve hipoksi ile uyarılabilir faktör-1'in iNOS'a bağlanma afinitelerini inhibe ederek iNOS'un transkripsiyonunu bozar ve sitokinler tarafından uyarılabilirliğini azaltır (162, 163).

Son yıllarda çok sayıda yeni transmembran iyon taşıyıcıları klonlanmış ve bunlardan en az bir tanesi intrasellüler patojenlere karşı immün savunmada merkezi rol oynamaktadır. Bu gen NRAMP-1 (natural resistance-associated macrophage protein-1)'dir. Bu gen monosit, makrofaj ve nötrofillerde primer olarak eksprese olan ve 12 tane yüksek hidrofobik özelliğe sahip transmembran parçaya sahip olan integral fagolizozomal bir proteini kodlar (164, 165). NRAMP-1' in hücreiçi patojenler olan leishmania, salmonella veya mikobakterilere karşı koruduğu anlaşılmıştır (165, 166). NRAMP-1' in demir taşıyıcısı olarak rolü halen tartışmalıdır (167). Bazı çalışmalar NRAMP-1'in demiri proton transportu ile fagolizozomal membranlardan geçirdiğini gösterirken (168-170), diğer yayınlar NRAMP1' in mangan gibi başka iyonların intrasellüler homeostazını sağladığını iddia etmişlerdir (171, 172). NRAMP-1 ile yüksek homoloji gösteren bir protein ise önceden NRAMP-2 olarak adlandırılmış olan Divalent metal transporter-1'dir (DMT-1) (173). DMT-1 sıçanların duodenumunda tanımlanmış olup hidrojen kotransportu yoluyla demir ve diğer metallerin uptake'ini sağlar, bu nedenle demirin vücudun ihtiyacına göre alınımı için majör bir düzenleyici olduğu

düşünülmektedir (174). Ayrıca DMT-1' in endozomdan eritroid hücrelere demir salınmasını sağladığı ve dolayısıyla bu proteinin mutasyonlarının DEA' sinde rolü olduğu düşünülmektedir (175). DMT-1 ekspresyonunun sitokinler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (176). Bir diğer demir taşıyıcısı IREG-1 veya diğer adıyla ferroportin içinde geçerlidir. Bu transmembran iyon taşıyıcısı enterositin bazolateral membranından demirin dolaşıma taşınmasını sağlar. Ayrıca makrofajlardan demir atılımını düzenlediği ve dolayısıyla TH-1 aracılı immüniteyi düzenlediği düşünülmektedir (147-149). Herediter Hemokromatozis vakalarının %70-100'ünde High Fe (HFE) olarak adlandırılan ve hücrelerde yaygınca eksprese edilen bir MHC-I molekülünde homozigot nokta mutasyonu saptanmıştır (177). Bu C282Y mutasyonu HFE' nin β -2 mikroglobulin ile etkileşimini bozarak fonksiyon kaybına neden olur (178). Bu durumun hayvan deneylerinde daha önce β -2 mikroglobulin geni tahrip edilmiş farelerde parankimal demir birikiminin artışı ile birlikte olduğu gösterilmiş ve CD8 hücrelerin eksikliği de gösterilmiştir (179-181). HFE' nin immün hücreler ile etkileşme kabiliyeti vardır. Gama-delta T hücrelerinin intestinal hücreler ile gama-delta reseptör-HFE antijeni etkileşimi ile iletişimde bulunabildiğini gösteren deliller bulunmuştur (182). Bu etkileşime örnek olarak, T hücreleri intestinal hücreler ile iletişime kurabilir ve bunun sonucunda immün efektör fonksiyonlar uyarılır (örneğin TNF- α oluşumu) ve intestinal hücrelerin proliferasyonu ve apoptozisi kontrol edilebilir.

Lenfositler ve monositler özel bir reseptör eksprese ederler, bu reseptör demir bağlayan bir protein olan, mukoza ve nötrofil granüllerinde bulunan laktoferrini spesifik olarak bağlar (183). Laktoferrin reseptörü şüana kadar çalışılmış olan lenfositlerin yaklaşık tamamının yüzeyinde bulunur. Şüana kadar ki en yüksek laktoferrin reseptör oranı gama-delta T hücrelerinde bulunmuştur ve Laktoferrin reseptörlerinin ekspresyonu lenfosit aktivasyonu ile ilgilidir (184). Bunun yanında laktoferrinin çeşitli başka immünregülatör fonksiyonları bulunmaktadır. Bunlar; sitokin oluşmasının kontrolü, antikor ve kompleman oluşumu ve NK hücresi fonksiyonlarıdır. (183, 185).

Sonuç olarak demirin immün sistemi etkilemesi ve tam tersine immün sistemin lokal ve sistemik demir üzerindeki etkileri üzerine çok sayıda yolaklar ortaya çıkarılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik kurul onayı

Bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Etik kurulundan (4.07.2012 tarih ve B.30. 2. ADÜ.0.20.05.00/050.04-162 sayılı klinik araştırmalar etik kurulu 2012/74 protokol nolu karar) onay alındı. Hastalardan çalışma yapmak ve kan örneği almak için bilgilendirilmiş yazılı onam alındı.

3.2. Hasta ve kontrol gurubu

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Hematoloji polikliniğine başvuran ve hemoglobin düzeyi kadınlarda 11 g/dl, erkeklerde 12 g/dl altında olan, serum ferritin düzeyi 16 ng/ml, demir satürasyonu %15'in altında olan DEA tanısı koyulan 18-80 yaş arasındaki 70 hasta çalışmaya alındı. Kontrol gurubu olarak aynı yaş aralığında ve anemisi olmayan aşağıdaki dışlanma ölçütlerine uygun 30 sağlıklı birey çalışmaya alındı.

Hasta ve kontrol gurubu için dışlanma ölçütleri;

- 1-Kanser ve hematolojik maligniteler,
- 2-Kronik enfeksiyon ve inflamatuvar hastalıklar,
- 3-Akut kan kaybı,
- 4-Diabetes mellitus ve endokrin hastalıklar,
- 5-İskemik kalp hastalığı,
- 6-DEA dışındaki anemiler,
- 7-Kronik karaciğer hastalıkları,
- 8-Kronik böbrek hastalıkları,
- 9-Kronik alkolizm,
- 10-Düzenli olarak mineral/vitamin desteği alan bireyler,
- 11-Gebelik.

3.3. Örneklerin hazırlanması

Çalışma kriterlerine uygun kabul edilen bireylerden ön kol veninden uygun koşullarda yeterli miktarda iki farklı tür kan örneği alındı. EDTA'lı tüp içine alınan kan örnekleri tam kan ve akım sitometrik inceleme için alındı ve hemen çalışıldı. Akım sitometrik yöntem ile lenfosit alt gurupları (CD3,CD4,CD5,CD8,CD19 ekspresyonları,CD4/CD8 oranı) araştırıldı. Sitokinler(IL-2, IL4, IL6), immunglobinler (IgG, IgA, IgM) ve kompleman düzeyleri(C3 ve C4) için biyokimya tüpüne alınan kan örneklerinin 4000 rpm'de 5 dakikada santrifüj edildikten sonra üstündeki plazması alındı. Alınan plazma örneği çalışma yapılncaya kadar ependorf tüplerinde -80° C'de saklandı.

3.4. Hematolojik parametreler

Tam kan için hemoglobin ve hematokrit düzeyleri, lökosit, trombosit, lenfosit ve monosit sayıları, ortalama eritrosit hacmi (OEH), ortalama eritrosit hemoglobini (OEHB), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (OEHK), eritrosit dağılım aralığı (RDW) Mindray BC-6800 model cihazı ile fotometrik yöntem ile çalışıldı. Serum demiri, demir bağlama kapasitesi, ferritin düzeyleri Abbott C8000 model cihaz ile spektrometrik yöntem ile araştırıldı.

3.5. Biyokimyasal analizler

Biyokimyasal analizler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarında yapıldı. Serum örneklerinde IL-2, IL-6 ve IL-4 düzeyleri ticari olarak satılan eBioscience firmasına ait Platinum ELISA kitleri ile saptanmış olup, değerleri pg/ml cinsinden verildi. Katalog numaraları sırasıyla; BMS221/2, BMS213/2, BMS225/2'dir. Serum örneklerinde oluşan rengin absorbansı ise ELx800 ELISA okuyucuda otomatik olarak hesaplandı.

3.6. Akım sitometrik incelemeler

Akım sitometrik incelemeler için Adnan Menderes Üniversitesi Hematoloji BD'da akım sitometri Laboratuvarında bulunan akım sitometri cihazı (Beckman Coulter Epics XL-MCL model cihaz) kullanıldı. EDTA'lı tüp içine alınan kan örnekleri hemen çalışıldı. Akım sitometrik yöntem ile lenfositlerde CD3, CD4, CD5, CD8, CD19 ekspresyonları ile CD4/CD8 oranı araştırıldı.

3.7. Mikrobiyolojik incelemeler

Mikrobiyolojik analizler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Serum örneklerinde IgG, IgA, IgM, C3, C4 düzeyleri ticari olarak satılan SPINREACT, S.A. Ctra. Santa Coloma, 7E-17176 sant esteve de bas spain firmasına ait Spinreact kitleri ile mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan Prestige 24i adlı cihazda Turbidimetri yöntemi ile çalışılarak, değerleri mg/dl cinsinden verildi.

3.8. İstatistiksel yöntem

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki sayısal verilerin karşılaştırılması SPSS 15.0 Windows ile student-t testi kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

DEA grubundaki 70 hastanın ikisi erkek (%3) geri kalan 68'i kadındı (%97). Kontrol grubunda ise çalışmaya alınan 30 bireyin ikisi erkek (%7) geri kalan 28' i kadındı(%93.4). DEA grubunda yaş ortalaması 36 ± 13 iken, kontrol grubunda 29 ± 9 olarak saptandı ($p=0.008$). Tablo V' de her iki gurubun özellikleri verildi

Tablo V: Demografik veriler

Özellik	DEA	Kontrol
Hasta sayısı	70	30
Cins (E/K)	2/68	2/28
Yaş	36 ± 13	29 ± 9

DEA'li hastalarda etiyojisi değerlendirildiğinde en sık (%55.5) jinekolojik nedenler saptandı. Jinekolojik nedenler arasında disfonksiyonel uterus kanaması ve miyoma uteri ilk iki sırayı almaktaydı. Gastrointestinal nedenler ise ikinci sıklıkta (%19.7) olup en sık etiyojistik neden kronik gastritlerdi. Tüm incelemelere rağmen hastaların %24.2'sinde etiyojisi saptanamadı. Tablo VI'da tüm etiyojistik nedenler verildi.

Her iki grupta tam kan incelemeleri karşılaştırıldığında DEA'li hastalarda hemoglobin ve hematokrit düzeyleri, OEH, OEHb, OEHK değerleri kontrol gurubundan düşük iken RDW değerleri yüksekti ($p<0.001$). DEA'li hastalarda lökosit sayısı kontrol gurubundan düşük iken ($p=0.025$), trombosit belirgin derecede yüksekti ($p=0.008$). Ancak lenfosit ve monosit sayıları arasında fark yoktu ($p>0.05$). Tablo-VII'de her iki gurubun tam kan verilmiştir. DEA'li hastalarda demir düzeyi ortalama 20.2 ± 11.6 ug/dl, demir bağlama kapasitesi 396.2 ± 43 ug/dl, ferritin düzeyi 3.6 ± 3.2 ng/ml, ve demir satürasyonu $\%4.9\pm2.8$ olarak bulunmuştur. Tablo-VIII' da DEA'li hastalarda demir parametreleri görülmektedir.

Tablo VI: Hastalarda DEA'nin etiyolojisi

Etiyoloji	Hasta sayısı (n:70)	% oranı
Saptanamayan	17	24.2
Disfonksiyonel uterus kanaması	15	21.4
Miyoma uteri	14	20
Ovaryal kist	6	8.5
Kronik atrofik gastrit	5	7.1
Çölyak	3	4.2
Endometriyal hiperplazi	3	4.2
Kronik aktif gastrit	2	2.8
Gastrik polip	1	1.4
Gastroenterestomi operasyonu	1	1.4
Rektum kanseri	1	1.4
Hemoroid	1	1.4
Kronik endometrit	1	1.4

Tablo VII: Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının tam kan değerleri

Parametreler	DEA (n:70)	Kontrol (n:30)
Hemoglobin (g/dl)	9.3±1.2 ⁺	13.4±0.8
Hematokrit (%)	30.4±3.3 ⁺	39.5±2.9
OEH (fl)	70.1±8.2 ⁺	84.4±4
OEHb (pg)	21.5±3.4 ⁺	28.7±1.6
OEHK (g/dL)	30.4±1.7 ⁺	34±1.2
RDW(%)	17.6±1.9 ⁺	14.1±0.8
Lökosit sayısı (/μL x10³)	6.3±1.8 ⁺⁺	7.2±1.8
Lenfosit sayısı (/μL x10³)	1.9±0.6	2±0.5
Monosit sayısı (/μL x10³)	0.4±0.1	0.4±0.1
Trombosit sayısı(/μLx10³)	328±96 ⁺⁺⁺	277±75

⁺: p<0.001, ⁺⁺: p<0.05, ⁺⁺⁺:p<0.01

Tablo VIII: DEA grubunda demir parametreleri

	Serum demiri (ug/dl)	Serum demir bağlama kapasitesi (ug/dl)	Serum ferritin (ng/ml)	Demir satürasyonu (%)
DEA (n=70)	20.2±11.6	396.2±43	3.6±3.2	4.9±2.8

Akım sitometrik incelemesi sonrasında lenfositlerdeki CD3, CD4, CD5, CD19 ve CD8 ekspresyonları CD4/CD8 oranları bakımından her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Tablo-IX'de akım sitometrik inceleme sonuçları verildi.

DEA'li hastalardaki interlökin (IL-2, IL-4, IL-6), kompleman (C3 ve C4) ve IgG ve IgM düzeyleri kontrol gurubundan farklı değildi. DEA'li hastalarda IgA düzeyleri kontrol gurubundan yüksek saptandı ($p=0.004$). Tablo X' de bu veriler özetlenmiştir.

Tablo IX: Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının hücresel immünite verileri

Parametreler	DEA (n=70)	Kontrol (n=30)
CD3 (%)	63.9±19.9	69.2±10.5
CD4 (%)	45.5±8.9	42.1±11.7
CD5 (%)	62.8±12.3	63.1±11.3
CD8 (%)	44.6±9.6	42.4±10.9
CD19 (%)	9±4	9±3.9
CD4/CD8	1.1±0.3	1.1±0.3

Tablo X: Hasta ve kontrol gurubunun immün parametreleri

Parametreler	DEA (n:70)	Kontrol (n:30)
IL-2 (pg/ml)	18±34.5	12.4±19.3
IL-4(pg/ml)	21.6±23.4	22.8±20.7
IL-6(pg/ml)	6.7±4.5	5.5±4.1
IgA(mg/dl)	237.2±109.6	172.1±75.6
IgM(mg/dl)	161.7±78.1	143.1±59.5
IgG(mg/dl)	1195±267.4	1128.7±290.4
C3(mg/dl)	109.1±18.6	113.1±19.6
C4(mg/dl)	20.4±5.9	23.3±8.5

5. TARTIŞMA

Bu tezde hücrel immünite açısından incelenen CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD4/CD8 oranı, IL2, IL4, IL6 parametrelerinde DEA ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

Tang ve ark. (23) hemoglobin düzeyi 6 gr/dL olan DEA' li gebelerde CD3, CD4 düzeyleri, CD4/CD8 düzeyleri ile serum IL-2 düzeyleri anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır. Bu çalışmada hemoglobin düzeyindeki düşme düzeyi ile immün indekslerdeki düşme paralel olarak saptanmıştır. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak gebe kadınlar değerlendirilmiştir. Gebelerde hücrel immünite ve T lenfosit alt gruplarının anemi olmaksızın değerlendirildiği bir çalışmada gebelikte birlikte hücrel immünitede azalmanın T lenfosit alt gruplarında değişmeyle birlikte ve buna bağlı olabileceği öne sürülmüştür (186).

Hayvan çalışmalarında demir eksikliğinin seviyesi ile immünitedeki azalmanın ilişkisi gösterilmiştir (187, 188). Bu durum insan çalışmalarında da gösterilmiştir (189, 190).

Post-partum dönemdeki gebelerde ise Zimmer ve ark. (191) tarafından yapılan bir çalışmada demir durumu ve immünite arasında korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmada T lenfosit alt grupları ile ilişkili demir eksikliği parametrelerinden transferin saturasyonunun ferritin ve hemoglobin düzeyine kıyasla daha iyi bir belirteç olduğu saptanmıştır. Lenfositler için transferine bağlı demirin, demir için ana kaynak olduğu düşünülürse bu durum ciddi demir eksikliği oluşmadan T lenfositlerin kolaylıkla etkilenmemesinin nedeni olabilir (192).

Erişkinlerde ve çocuklarda da akım sitometrik olarak yapılan lenfosit alt grup çalışmalarında da CD3, CD4 ekspresyonlarında azalma ortaya konmuştur (189, 190, 193-195). Erişkinlerde Santos ve ark. (193) tarafından yapılan bir çalışmada DEA'li 21 hastada total lenfosit, CD3 ve CD4 alt grupları ile B lenfosit sayılarında azalma gözlenmiştir. Bu hastalarda tedavi sonrasında 16 bireyde total lenfosit, CD3 ve CD4 alt grupları ile B lenfosit sayılarında düzelme gözlenmiştir. Luraschi ve ark. (194) tarafından yine erişkinlerde yapılan 24 hastalık çalışmada DEA hastalarda CD3 ve CD8 düzeylerinde azalma ile CD4/CD8 oranında anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Tedavi sonrası demir eksikliği düzelen 10 hastada CD3 ve CD8 sayıları ile CD4/CD8 oranları düzelirken, aneminin düzelmediği 5 hastada bu bozukluğun devam ettiği gözlenmiştir.

Pediyatrik grupta yapılan bir başka çalışmada ise Mullick ve ark. (189) DEA anemili 40 hastada T lenfosit sayısı ile CD4, CD8, CD4/CD8 oranı değerlendirmiş ve T lenfosit sayısı, CD4 ve CD4/CD8 oranı anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Üç aylık tedavi sonrasında ise CD4 düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Berger ve ark. (190) 220 çocukta T lenfosit sayısı ile CD4/CD8 oranları daha düşük olarak bulunmuştur. Ancak gecikmiş tip

hipersensitivite ile değerlendirilen hücresel immünitede bozulma saptanmamıştır. CD3 oranlarındaki düşüklük ile eritrosit serbest protoporfirin, ortalama eritrosit hacmi (OEH), serum demiri ve transferrin satürasyonu arasında bir korelasyon saptamışlardır, yine bu çalışmada 9 g/dl'nin altındaki hastalarda CD3 oranları daha düşük bulunmuştur. 6 ay-3 yaş arasındaki 81 çocuk hastanın alındığı çalışmalarında Thibault ve ark. (195) DEA grubunda IL2 düzeyini daha düşük bulmuşlardır.

DEA'li hastalarda demir tedavisi sonrasında lenfosit alt gruplarında düzeltilmeler bazı çalışmalarda da gösterilmiştir (193-196). Lenfosit alt gruplarında tedavi ile bir değişiklik gözlemlenmediğini bildiren yayınlar da mevcuttur (197, 198).

Keramati ve ark. (199) premenapozal DEA'li kadınlarda CD3, CD3/CD4, CD3/CD8 ve T lenfosit sayılarında azalma saptarlarken CD4/CD8 oranları ve CD19 sayılarında anlamlı değişiklik görmemişlerdir. Liu ve ark. (200) üst solunum yolu enfeksiyonu ve DEA olan 63 çocukta hücresel immunitiyi değerlendirdikleri bir çalışmada IL-2 aktivitesi, CD3, CD4+ hücre yüzdesi ve CD4/CD8 oranlarında düşüklük saptamışlardır.

DEA ile ilgili çalışmalar değerlendirildiğinde çalışmaların ağırlıklı olarak çocuk, gebe ve postpartum kadınlar gibi çalışmamıza almadığımız hasta gruplarında ağırlıklı olması çalışmamızda hücresel immünite parametreleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmamasını açıklayan temel faktör olabilir. Erişkinlerde yapılan en büyük hasta sayılı çalışmadaki hasta sayısı 50'dir (199). Bu durum belki de yeterli kohorta erişildiğinde tablonun değişik olabileceğini düşündürmektedir. Yine DEA ile hücresel immünitenin değerlendirildiği bir çalışma ülkemizde daha önce yapılmamıştır, bu durum literatür ile çalışmamız arasındaki farklılığın genetik veya çevresel faktörlerle de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Aneminin seviyesi ile hücresel immünitedeki bozulmanın korelasyon gösterdiği erişkin ve pediatrik gruplarda gösterilmiştir (189, 190). Çalışmamızda anemi seviyesinin diğer çalışmalarla farklılığı bu durumu açıklayıcı faktörlerden birisi olabilir.

Çalışmamızda humoral immünite açısından araştırılan IgG, Ig M, C3 ve C4 gibi parametrelerde DEA ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark izlenmezken IgA düzeyi DEA'li hastalarda kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksekti.

Humoral immünite üzerinde demir eksikliğinin rolü tartışmalıdır. Çeşitli çalışmalarda demir eksikliğinde immünglobulin düzeyleri araştırılmıştır (15,21-25). Ülkemizden konuyla ilgili olan tek çalışmada Ekiz ve ark. (15) DEA'li çocuklarda serum immünglobülin düzeyleri araştırılmış ve IgG4 düzeylerinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Guzikowska ve ark. (25) 6 ay-3 yaş arasındaki DEA'li 50 çocukta serum IgA ve IgM düzeylerinde azalma saptamışlardır. Tang ve ark. (23) ise DEA'li gebelerde hem hücresel (T lenfosit ve naturel

killer hücre ile) hem de humoral immunitenin DEA’de etkilendiğini saptayarak IgG düzeyinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Feng ve ark. (21) çocuklarda hücrel immünite parametrelerindeki bozuklukların yanısıra IgG1 ve IgG4 alt sınıflarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Sadeghian ve ark. (22) DEA’li 45 hastada Ig düzeylerinde anlamlı bir düşüklük saptamamışlardır, ancak IgM düzeyleri orta-şiddetli anemili hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Galan ve ark. (201) 142 çocuğun değerlendirildiği çalışmalarında inflamasyon markerleri yüksek olan 62 hasta dışlandığında geriye kalan 80 çocukta serum immünoglobulin düzeyleri ile birlikte C3 ve C4 düzeyleri de incelenmiştir. Sadece IgG ve IgA düzeyinde anlamlı düşüklük non-anemik demir eksikliği grubunda izlenirken, diğer belirteçler farklı bulunmamıştır. DEA gelişmiş grupta ise bu farklılıklar gözlenmemiştir. Bu durum demir dışı başka faktörlerin de bu duruma yol açabileceğini düşündürmektedir. Yine bu çalışmada alınan hastaların çoğunlukla bir yaş altında olması nedeniyle immün sistemin değerlendirilmesinde eksiklikler olabileceği de düşünülebilir.

MacDougall ve ark. (16) yaptıkları çalışmada 20 DEA’li ve 7 latent DEA olan çocukta humoral ve hücrel immünite değerlendirilmiştir. Serum IG konsantrasyonları ve tükrük IgA düzeyleri normal iken C3 konsantrasyonu artmış bulunmuş. Bu anormallikler belirgin anemi gelişmeden önce latent DEA döneminde gözlemlendiğinden immün fonksiyondaki bozulmanın DEA nin erken bir bulgusu olabileceğini düşündürebilir. Bu çalışmada DEA tedavisinden sonraki 2-3. aylarda normal sonuçlara ulaşılmıştır. Bagchi ve ark. (202) 14 DEA’li çocuğun alındığı çalışmalarında difteri ve tetanoz toksoidleri ile aşılama sonrası hem hasta hem de kontrol grubunda IgG artışı gözlenmiş olmasına karşın iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.

Sonuç olarak humoral immünite ve DEA ilişkisini değerlendiren çalışmalar az sayıdaki hastalarla, farklı etnik gruplarda ve ağırlıklı olarak gebe ve çocuklarda yapılmıştır. Ülkemizden yapılan tek çalışma da çocuklarda yapılmıştır. Bu durum hem farklı genetik özelliklerle hem de immunitenin azaldığı çocuk ve gebelik ile ilişkili olabilir. Literatürde gebe olmayan erişkin DEA’li hastalarda Sadeghian ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada Ig düzeylerinde anlamlı bir düşüklük saptanmamıştır, ancak IgM düzeyleri orta-şiddetli anemili hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak hastalarda etyolojik değerlendirme yapılmamış olması immün yanıtı etkilerken anemiye yol açabilecek parazit enfeksiyonları, çölyak hastalığı gibi etyolojilerin araştırılmamış olması sonuçları yorumlamayı güçleştirmektedir.

DEA etiyolojisi açısından değerlendirme yapıldığında ise literatürde farklı veriler dikkati çekmektedir. Hershko ve ark. (203) tarafından erişkin hastanede yapılan hastalarda DEA etiyolojisinin incelendiği çalışmaya alınan 262 hastada %34 oranında etyoloji saptanamamışken benign gastrointestinal lezyonlar yaklaşık %50 oranında, malign gastrointestinal lezyonlar ise %5 oranında saptanmıştır. Bu çalışmaya alınan hastaların yarısından fazlasının 70 yaş üstü olduğu ve erkek-kadın oranının 1-1.8 olduğu bildirilmiştir. Warsch ve ark. (204) tarafından oral demire dirençli hastalarda DEA etiyolojisinin araştırıldığı çalışmada % 22 ile solid tümörler ve yine %22 ile inflamatuvar barsak hastalıkları önde gelen nedenler olurken gastrik by-pass %15, jineokolojik nedenler %13, gastrointestinal kanamalar %9, hematolojik malignite veya diğer bozukluklar %8, renal hastalıklar %6 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada bilinmeyen nedenler %6 olarak bildirilmiştir. Annibale ve ark. (206) yaptıkları çalışmalarında gastrointestinal semptomu olmayan refrakter DEA'li 71 hastada (51 kadın, yaş ortalaması 59) kolonoskopi ve endoskopi ile gastrointestinal tarama gerçekleştirmişlerdir. Hastaların % 37 kadarında kanamaya neden olabilecek mide kanseri, kolon kanseri, peptik ülser, erozyonlu hiatus hernisi, kolonik anjiodisplazi, kolon polipleri ve Crohn hastalığı gibi nedenlerin olduğunu saptamışlardır. Kanamaya neden olmadan anemi yapabilecek patoloji olarak 19 hastada atrofik gastrit, 13 hastada Helikobakter pilori gastriti ve 4 hastada çölyak hastalığı olduğunu bildirmişlerdir. Kanamalı lezyonu olan hasta grubunda yaş ortalaması 70 iken kanamasız lezyonu olan grupta yaş ortalaması 56 olarak bulunmuştur. Bu durum özellikle daha genç hasta grubunda Çölyak hastalığının DEA varlığında olasılıklardan biri olarak akılda tutulmasını gerektirir.

Çalışmamızda humoral immünite bakımından DEA'li hastalardaki IgA yüksekliği çölyak hastalığı nedeniyledir. Çölyak hastalarında IgA düzeyinde artış olması mukozayı direk etkileyen bir patolojidir (203). Çölyak hastalığının demir eksikliği anemisinde subklinik olabileceği ve rölatif olarak sık olduğu bildirilmiştir (204). Ülkemizden yapılan bir başka çalışmada Çekin ve ark. (205) DEA'li hastalarda % 7.14 ile çölyak hastalığı prevalansının toplum normlarına göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir, yine bu çalışmanın çalışmamıza benzer yönü hasta grubunun ağırlıklı olarak premenopozal kadınlardan oluşmasıdır.

Çalışmamızda etiyolojik faktörlere bakıldığında hastaların yarısından fazlasında etyolojik neden olarak jineokolojik nedenlerin olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum demir eksikliğinde immün yanıtı etkileyebilecek malignite, kronik inflamatuvar hastalıklar ve gebelik gibi durumların dışlanmasıyla birlikte immün yanıtın bizim çalışmamızda etkilenmemesinin nedeni olabilir. Yine yapılan çalışmalarda seçilen popülasyonun ağırlıklı

olarak gebe veya pediatrik grupta olması bu hastalarda demir eksikliği dışında immün sistemin gelişiminin tamamlanmamış veya baskılanmış olması ile açıklanabilecek bir durum olabilir. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda cinsiyet dağılımının bizim çalışmamızda olduğu kadar kadın predominant olmaması da yine literatür ile çalışmamızdaki farklılıkların cinsiyet kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada DEA'lı hastalarda hücrel ve humoral immünite etkilenmemiştir. DEA'lı hastalarda IgA yüksekliği Çölyak hastalığı için uyarıcı olmalıdır. Bununla birlikte DEA'nın bir hastalık olmadığı ve hastalar semptomatik olmasa bile kan kaybı açısından gastrointestinal sistemin endoskopik incelenmesi ve premenapozal kadınlarda jinekolojik değerlendirilme yapılmalıdır.

6.ÖZET

Amaç

Demirin immün hücreler için büyüme uyarıcı, sitokin aktivitesindeki ve hücre aracılı immün efektör yollarına olan etkisinin saptanmasıyla günümüzde immünitenin devamlılığının sağlanmasında önemi anlaşılmıştır. Bu çalışmada demir eksikliği anemisinde hücre ve humoral immunitenin değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya hemoglobin düzeyi kadınlarda 11 g/dl, erkeklerde 12 g/dl altında olan, serum ferritin düzeyi 16 ng/ml, demir saturasyonu %15'in altında 70 DEA'li hasta (68 kadın ve 2 erkek, yaş ortalaması 36±13 yıl) alındı. Kontrol grubu olarak aynı yaş aralığında anemisi, kanser ve hematolojik maligniteleri, kronik enfeksiyon ve inflamatuvar hastalıkları, diabetes mellitus ve endokrin hastalıkları, akut kan kaybı, kronik karaciğer hastalıkları, kronik böbrek hastalıkları, kronik alkolizmi ve gebeliği olmayan düzenli olarak mineral/vitamin desteği almayan 30 sağlıklı birey (28 kadın ve 2 erkek, yaş ortalaması 29±9 yıl) çalışmaya alındı. Her iki grupta tam kan sayımı, akım sitometrik yöntem ile lenfosit alt grupları (CD3, CD4, CD5, CD8 ve CD19 ekspresyonları, CD4/CD8 oranı), elisa yöntemi ile sitokinler (IL-2, IL4, IL6), turbidimetri yöntemi ile de immunglobinler (IgG, IgA, IgM) ve kompleman düzeyleri (C3 ve C4) incelendi. Hasta ve kontrol gruplarındaki sayısal verilerin karşılaştırılması için SPSS 15.0 Windows ile student-t testi kullanıldı. p<0.05 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Her iki grup arasında lenfositlerdeki CD3, CD4, CD5, CD19 ve CD8 ekspresyonları ile CD4/CD8 oranları, interlökin (IL-2, IL-4, IL-6), kompleman (C3 ve C4) ve IgG ve IgM düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). DEA'li hastalarda IgA düzeyleri kontrol grubundan yüksek saptandı (p=0.004).

Sonuç

Bu çalışmada DEA'li hastalarda hücre ve humoral immunitenin etkilenmedi. DEA'li hastalarda IgA yüksekliği **Çöliyak** hastalığı için uyarıcı olmalıdır. Bununla birlikte DEA'nin bir hastalık olmadığı akla gelmeli ve hastalar semptomatik olmasa bile kan kaybı açısından gastrointestinal sistemin endoskopik incelenmesi ve premenopozal kadınlarda jinekolojik değerlendirilme yapılmalıdır.

7. SUMMARY

THE CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITIES IN PATIENTS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

Aim

It has been understood that iron is important for ensuring the continuity of immunity by determining the growth stimulator effect for immune cells, cytokine activity and cell-mediated immune effector pathways. We aimed to evaluate the cellular and humoral immunities in iron deficiency anemia (IDA) in this study.

Material and Method

Seventy patients (68 female and 2 male with mean age 36 ± 13 years) with IDA (hemoglobin levels less than 11 g/dl in female and 12 g/dl in male, serum ferritin level less than 16 ng/ml, and iron saturation below 15%) were enrolled to this study. 30 healthy subjects were accepted as the control group (28 women and 2 men with mean age 29 ± 9 years) without anemia, cancer, and hematologic malignancies, chronic infections and inflammatory diseases, diabetes mellitus and endocrine diseases, acute blood loss, chronic liver disease, chronic kidney disease, chronic alcoholism, pregnancy and regularly mineral/vitamin-supplemented. In both groups complete blood count, lymphocyte subgroups (CD3, CD4, CD5, CD8, and CD19 expression, CD4/CD8 ratio) by flow cytometric method cytokines by ELISA (IL-2, IL4, IL6), with turbidimetry method immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) and complement levels (C3 and C4) were analyzed. Student's t-test was used for the comparison of numerical data in the patient and control groups by SPSS 15.0 for Windows. p value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

The expressions of CD3, CD4, CD5, CD19, and CD8 with CD4/CD8 ratios in lymphocytes, the levels of interleukin (IL-2, IL-4, IL-6), complement (C3, C4) and IgG and IgM were not significantly different between in two groups ($p > 0.05$). IgA levels in patients with IDA were significantly higher than those of control group ($p = 0.004$).

Conclusion

The cellular and humoral immunities were not affected in patients with IDA. High IgA levels should be a warning for Celiac disease in patients with IDA. Moreover it should be kept in mind that IDA is not a disease by itself and even patients are asymptomatic, endoscopic examination of gastrointestinal system for blood loss and gynecological evaluation in premenopausal women must be performed.

8. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Iron deficiency: assesment, prevention and control. Geneva, Switzerland: World Health Organization: 2001.
2. Keskin Y, Moschonis G, Dimitrou M, et al. Prevalence of iron deficiency among schoolchildren of different socio-economic status in urban Turkey. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 64-71.
3. Kilinc M, Yuregir GT, Ekerbicer H. Anaemia and iron deficiency anaemia in South-east Anatolia. *Eur J Haematol* 2002; 69: 280-3.
4. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. Geneva, Switzerland: World Health Organization: 2008.
5. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 1997; 277:973.
6. Seligman PA, Kovar J, Gelfand EW. Lymphocyte proliferation is controlled both by iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology* 1992; 60: 19–26.
7. De Sousa M. Immune cell functions in iron overload. *Clin Exp Immunol* 1989; 75: 1–6.
8. Laskey J, Webb I, Schulman HM, et al. Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Exp Cell Res* 1988; 176: 87–93.
9. Weiss G, Wachter H, Fuchs D. Linkage of cellular immunity to iron metabolism. *Immunol Today* 1995; 16: 495–500.
10. De Sousa M, Reimao R, Porto G, et al. Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions. *Curr Stud Hematol Blood Transf* 1992; 2 :171–177.
11. Brock JH. Iron in infection, immunity, inflammation and neoplasia. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW, editors. *Iron Metabolism in Health and Disease*. Philadelphia, PA: Saunders Company; 1994: pp. 353–91.
12. Brekelmans P, van Soest P, Leenen PJ, et al. Inhibition of proliferation and differentiation during early T cell development by anti-transferrin receptor antibody. *Eur J Immunol* 1994; 24 : 2896–2902.
13. Mainou-Fowler T, Brock JH. Effect of iron deficiency on the response of Mouse lymphocytes to concanavalin A. Importance of transferrin bound iron. *Immunology* 1985; 54: 325–332.
14. Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism, and neuronal functioning. *J Nutr* 2001;131:568s-80s.

15. Ekiz C, Agaoglu L, Karakas Z, et al. The effect of iron deficiency anemia on function of the immune system. *Hematol J* 2005; 5: 579-83.
16. MacDougall LG, Anderson R, McNab GM, et al. The immune response in iron deficient children: Impaired cellular defense mechanisms with altered humoral components. *J Pediatr* 1975; 86: 833-43.
17. Kuvibidila S, Dardene M, Savino W, et al. Influence of iron deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T cell subsets and thymocyte proliferation. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:228-32.
18. Van Heerden C, Oosthuizen R, VanWyk R, et al. Evaluation of neutrophil and lymphocyte function in subjects with iron deficiency. *S African Med J* 1981; 89 : 111-3.
19. Ahluwalia N, Sun J, Krause D, et al. Immune function is impaired in iron deficient, homebound, older women. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:516-21.
20. Kumar V, Choudry VP. Iron deficiency and infection. *Indian J Pediatr* 2010;77:789-93.
21. Feng XB, Yang XQ, Shen J. Influence of iron deficiency on serum IgG subclass and pneumococcal polysaccharides specific IgG subclass antibodies. *Chin Med J* 1994;107:813-6.
22. Sadeghian MH, Keramati MR, Ayatollahi H, et al. Serum immunoglobulins in patients with iron deficiency anemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2010; 26 :45-8.
23. Tang YM, Chen XZ, Li GR, et al. Effects of iron deficiency anemia on immunity and infectious disease in pregnant women. *Wei Sheng Yan Jiu* 2006; 35: 79-81.
24. Leush SS, Futorny SS. Humoral immunity in women with a normally proceeding pregnancy and in pregnancy complicated by iron deficiency anemia. *Lik Sparva* 1997; 4: 107-10.
25. Guzikowska E, Cholewa Z, Bujniewicz E, et al. Various parameters of humoral and cellular immunity in children with iron deficiency. *Pol Tyg Lek* 1989; 44:718-9.
26. Howell JT, Monto RW. Syndrome of anemia, dysphagia and glossitis (Plummer Vinson syndrome). *N Engl J Med* 1953; 249:1009.
27. Crosby WH. Whatever became of chlorosis? *JAMA* 1987; 257:2799.
28. Osaki T, Ueta E, Arisawa K, et al. The pathophysiology of glossal pain in patients with iron deficiency and anemia. *Am J Med Sci* 1999; 318:324.
29. Trost LB, Bergfeld WF, Calogeras E. The diagnosis and treatment of iron deficiency and its potential relationship to hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:824.
30. Lipschitz D. Medical and Functional Consequences of Anemia in the Elderly. *J Am Geriatr Soc* 2003; 10: 1532-1538

31. Simpson E, Mull JD, Longley E, et al. Pica during pregnancy in low-income women born in Mexico. *West J Med* 2000; 173:20.
32. Kettaneh A, Eclache V, Fain O, et al. Pica and food craving in patients with iron-deficiency anemia: a case-control study in France. *Am J Med* 2005; 118:185.
33. Reynolds RD, Binder HJ, Miller MB, et al. Pagophagia and iron deficiency anemia. *Ann Intern Med* 1968; 69:435.
34. Rector WG Jr. Pica: its frequency and significance in patients with iron-deficiency anemia due to chronic gastrointestinal blood loss. *J Gen Intern Med* 1989; 4:512.
35. Allen RP, Auerbach S, Bahrain H, et al. The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol* 2013; 88:261.
36. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. *Blood* 2003; 101:3359.
37. Cook JD, Finch CA, Smith NJ. Evaluation of the iron status of a population. *Blood* 1976; 48:449.
38. Rose MG, Berliner N. Red blood cells. In: *Hematologic pathophysiology*. Lippincott Raven, Philadelphia, 1998:63.
39. Beşışık SK. Demir eksikliği anemisi. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Dergisi* 2004;2(2):96-102.
40. Adamson JW. çev. Nevruz O, Güvenç B, Demir eksikliği ve diğer hipoproliferatif anemiler. In: Brunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison iç hastalıkları prensipleri*, çev. ed. Sağlık Y. Cilt 1 15.B. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004:660-666.
41. Aydın Y. Demir eksikliği anemisi. In: Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. *Cerrahpaşa iç hastalıkları*. 1.B. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2005:145-147.
42. Algarine C, Peiano P, Garrido M, Pizarro F, Lozoff B, Iron deficiency anemia in infancy: Long- lastinnig effects on auditory and visual system functioning. *Pediatr Res* 2003;53:217-223.
43. Han AP, Yu C, Lu L, et al. Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J* 2001; 20:6909.
44. Cook JD, Skikne BS. Iron deficiency: definition and diagnosis. *J Intern Med* 1989; 226:349.
45. Annibale B, Capurso G, Chistolini A, et al. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *Am J Med* 2001;

111:439.

46. Ioannou GN, Rockey DC, Bryson CL, et al. Iron deficiency and gastrointestinal malignancy: a population-based cohort study. *Am J Med* 2002; 113:276.
47. Ho CH, Chau WK, Hsu HC, et al. Predictive risk factors and prevalence of malignancy in patients with iron deficiency anemia in Taiwan. *Am J Hematol* 2005; 78:108.
48. Lee GR, Foerster J, Lukens J. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1999:979-1011.
49. Hershko C, Hoffbrand AV, Keret D, et al. Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *Haematologica* 2005; 90:585.
50. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362: 383–91.
51. Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 2005; 128 (Suppl 1):S74–S78
52. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP et al. ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:656–676
53. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636–51
54. Ginder GD. Microcytic and Hypochromic Anemias. In: Goldman L, Schafer AI (eds). *Goldman's Cecil Medicine*, 24th ed. United States of America, Elsevier Health Sciences, 2012:1039-1044
55. Loukas A, Prociv P. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:689-703.
56. Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV, Common intestinal parasites. *Am Fam Physician* 2004;69:1161-1168.
57. Hökelek M, Eroğlu C, Uyar Y, et al. Investigation of the effect of intestinal parasites on percentile values of the weight and height of primary school children. *Türkiye Parazitol Derg* 2000;24:43-46.
58. Özcan K, Yiğit S, Köksal F, et al. Adana ve çevresinde çengelli solucan araştırması. *Türkiye Parazitol Derg* 1989;13; 71-74.
59. Özcan K, Yiğit S, Koltas S, ve ark. Hatay'da çengelli solucan araştırması. *Türkiye Parazitol Derg* 1992;16:49-53.
60. Özcan K, Koltas S, Tanrıverdi S, ve ark. Hatay'daki bazı ilkokullarda bağırsak parazitleri araştırması. *Türkiye Parazitol Derg* 1994;18:461-468
61. Unat EK, Yücel A, Altaş K, ve ark. İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan

- hastalıkları. Unat'ın Tıp Parazitolojisi 1995. İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yay. No: 15, 5. baskı, İstanbul.
62. Üner A, Ertuğ S. Çengelli Solucan Hastalıkları. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları 2007. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. eds. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:22, İzmir.
63. Markell EK, Voge M, John DT, Medical Parasitology 1992. 7th ed. Philadelphia, W.B. Saunders, p.262-268.
64. Crompton DWT. Nutritional aspects of infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986, 80: 697-705.
65. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, et al. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. Gut 2011; 60:1309.
66. Rockey DC, Cello JP. Evaluation of the gastrointestinal tract in patients with iron-deficiency anemia. N Engl J Med 1993; 329:1691.
67. Brittenham GM. Disorders of iron homeostasis: Iron deficiency and overload. In: Hematology Basic Principles and Practice, 6nd ed, Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LE, et al. (Eds), Elsevier Saunders, 2013.
68. Hillman RS, ault KA, Leporrier M, Rinder HM. Demir eksikliği anemisi. Klinik uygulamada Hematoloji,5. Baskı. Ankara: Ayrıntı Basımevi,2011:53-64.
69. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. N Engl J Med 2005; 352:1011.
70. Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. Int J Clin Lab Res 1998; 28:1.
71. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, et al. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. JAMA 1999; 281:2225.
72. Fishbane S, Galgano C, Langley RC Jr, et al. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. Kidney Int 1997; 52:217.
73. Lok CN, Loh TT. Regulation of transferrin function and expression: review and update. Biol Signals Recept 1998; 7:157.
74. Cook JD. Clinical evaluation of iron deficiency. Semin Hematol 1982; 19:6.
75. Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. N Engl J Med 1982; 306:1520
76. Zanella A, Gridelli L, Berzuini A, et al. Sensitivity and predictive value of serum ferritin and free erythrocyte protoporphyrin for iron deficiency. J Lab Clin Med 1989; 113:73.
77. Tran TN, Eubanks SK, Schaffer KJ, et al. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. Blood 1997; 90:4979.
78. Adamson JW. Iron deficiency and other hypoproliferative anemias. In: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J (eds). Harrison's principles of internal

- medicine, 18th ed. United States of America, McGraw-Hill companies, 2012:844-851.
79. Finch CA, Bellotti V, Stray S, et al. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J Med* 1986; 145:657.
 80. Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, et al. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med* 1992; 7:145
 81. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, et al. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998; 44:45.
 82. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052.
 83. van den Broek NR, Letsky EA, White SA, et al. Iron status in pregnant women: which measurements are valid? *Br J Haematol* 1998; 103:817.
 84. (Weiss G, Goognough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl j Med* 2005 ;352 :1011-23)
 85. Hansen TM, Hansen NE. Serum ferritin as indicator of iron responsive anaemia in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:596.
 86. Weiss G, Goognough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl j Med* 2005 ;352 :1011-23
 87. Coelho AL, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Chemokines* 2005; 6: 553-560
 88. Knight JA. Review: Free Radicals, antioxidants and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2): 145-158
 89. Powrie F, Coffman RL. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Trends in Pharma Sci* 1993; 5: 164-168
 90. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348.
 91. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, et al. A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 1989; 143:518.
 92. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB Jour* 1991; 5: 171-177
 93. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7: 145-173
 94. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17 producing helper T cells. *Nature Immunol* 2007; 8: 950-957

95. Germann T, R  de E. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108:103.
96. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 1995; 103:161.
97. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16:374.
98. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16:34.
99. Arend WP. Cytokine inhibition in the treatment of rheumatic and inflammatory diseases. *Jap J Rheumatol* 1998; 8:333.
100. Lan Q, Zheng T, Rothman N, et al. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107:4101.
101. Warren JS, Kunkel SL, Cunningham TW et al. Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O₂ responses by rat alveolar macrophages. *Am J Pathol.* 1988 March; 130(3): 489–495.
102. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170:2081.
103. de Vries JE, Zurawski G. Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106:175.
104. Leung DY. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:302.
105. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:87.12.
106. Strieter RM, Koch AE, Antony VB, et al. The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Lab Clin Med* 1994; 123:183.
107. Firestein GS, Zvaifler NJ. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 1987; 30:864.
108. Wahl SM, Allen JB, Wong HL, et al. Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor-beta and IL-1 in rheumatoid synovium. *J Immunol* 1990; 145:2514.
109. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165.

110. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collageninduced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007; 37:3021.
111. Diebold RJ, Eis MJ, Yin M, et al. Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:12215.
112. McInnes IB. Cytokines. In: Kelley's textbook of rheumatology, 9th ed, Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE et al(Eds). Elsevier 2013: 369-381
113. Schroeder H, Wald D, Greenspan N. Immunoglobulins: structure and function. In Paul W, editor: *Fundamental immunology*. 2008, Lippincott-Raven, pp 125–151.
114. Edmundson AB, Ely KR, Abola EE, et al. Conformational isomerism, rotational allomerism, and divergent evolution in immunoglobulin light chains. *Fed Proc* 1976; 35: 2119.
115. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al. Structural variation in immunoglobulin constant regions. In *Immunobiology*, 2001, Garland, pp 142.
116. Capra JD, Edmundson AB. The antibody combining site. *Sci Am* 1977; 236: 50.
117. Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 471.
118. Nimmerjahn F, Ravetch JV. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med* 2007; 204: 11.
119. Orduno NM, Grimaldi C, Diamond B. B Cells. In: Kelley's textbook of rheumatology, 9th ed, Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE et al(Eds). Elsevier 2013: 191-215
120. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ et al: The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* 2003; 170: 3528–3533.
121. Brewer JW, Randall TD, Parkhouse RM et al. IgM hexamers. *Immunol Today* 1994; 15: 165.
122. Woof JM, Kerr MA: The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 2006; 208: 270–282
123. Chen K, Cerutti A: New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev* 2010; 237:160–179.
124. Gould HJ, Sutton BJ: IgE in allergy and asthma today, *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 205–217, 2008.

125. Karp DR, Holers VM. Complement in health and disease. In: Goldman L, Schafer AI (eds). *Goldman's Cecil Medicine*, 24th ed. United States of America, Elsevier Health Sciences, 2012:239-245
126. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058.
127. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1140.
128. Mizuno M. A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis. *Curr Med Chem*. 2006;13(14):1707
129. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, et al. Control of the complement system. *Adv Immunol* 1996; 61:201.
130. Romagnani S. The Th1/ Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 263–7.
131. Thorson JA, Smith KM, Gomez F et al. Role of iron in T cell activation: Th-1 clones differ from Th-2 clones in their sensitivity to inhibition for DNA synthesis caused by IGG MAbs against transferrin receptor and the iron chelator desferrioxamine. *Cell Immunol* 1991; 134: 126–7.
132. Porto G, Reimao C, Goncalves C, et al. Haemochromatosis as a window into the study of the immunological system in men: a novel correlation between CD8+ lymphocytes and iron overload. *Eur J Haematol* 1994; 52: 283–8.
133. Moura E, Noordermeer MA, Verhoeven N, et al. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. 1998; 92: 2511–9.
134. Weiss G. Iron acquisition by the reticuloendothelial system. In: Templeton D, editor. *Blood Molecular and Cellular Iron Transport*. New York, NY: Marcel Dekker; 2002, pp. 467–86.
135. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, et al. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9: 200–5.
136. Rouault TA, Klausner R. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Current Top Cell Regul* 1997; 35: 1–6.
137. Hentze MW, Kühn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8175–80.
138. Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* 1998; 2: 383–8.
139. Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, et al. Iron regulation of transferrin receptor mRNA

- levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the untranslated region of the mRNA. *EMBO J* 1989; 8: 3693–3699.
140. Müllner EW, Neupert B, Kühn LC. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmatic transferrin receptor mRNA. *Cell* 1989; 58: 373 – 382.
 141. Torti SV, Kwak EL, Miller SC, et al. The molecular cloning and characterization of ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor inducible gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 12638–12644.
 142. Wei YS, Miller SC, Tsuji Y, et al. Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 169: 298–306.
 143. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275: 161–203.
 144. Konijn AM, Carmel N, Levy R, et al. Ferritin synthesis in inflammation. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br J Haematol* 1981; 49: 361–368.
 145. Rogers JT. Ferritin translation by Interleukin-1 and interleukin-6: The role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood* 1996; 87: 2525–2537.
 146. Alvarez-Hernandez X, Licega J, McKay I, et al. Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest* 1989; 61: 319–322.
 147. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403: 776–81.
 148. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5: 299–309.
 149. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000; 275: 19906–12.
 150. Weiss G, Goossen B, Doppler W, et al. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/ NO-synthase pathway. *EMBO J* 1993; 12: 3651–7.
 151. Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin H, et al. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 1993; 12: 3643–50.
 152. Pantopoulos K, Hentze MW. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J* 1995; 14: 2917–24.
 153. Cairo G, Castrusini E, Minotti G, et al. Superoxide and hydrogen peroxide-dependent

inhibition of iron regulatory protein activity: a protective stratagem against oxidative injury. *FASEB J* 1996; 10: 1326–35.

154. Mulero V, Brock JH. Regulation of iron metabolism in murine J774 macrophages: role of nitric oxide dependent and independent pathways following activation with gamma interferon and lipopolysaccharide. *Blood* 1999; 94: 2383–9.
155. Seiser C, Teixeira S, Kühn LC. Interleukin-2 dependent transcriptional and posttranscriptional regulation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993;268:13074–80.
156. Weiss G, Bogdan C, Hentze MW. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1997; 158: 420–5.
157. Means RT, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992; 80: 1639–47.
158. Weinberg ED. Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes Infect* 2000; 2: 85–9.
159. Weiss G, Fuchs D, Hausen A, et al. Iron modulates interferon- γ effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol* 1992; 20: 605–10.
160. Recalcati S, Pometta R, Levi S, et al. Response of monocyte iron regulatory protein activity to inflammation: abnormal behavior in genetic hemochromatosis. *Blood* 1998; 91: 2565–72.
161. Weiss G, Werner-Felmayer G, Werner ER, et al. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med* 1994; 180: 969–76.
162. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323–50.
163. Dlaska M, Weiss G. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 1999; 162: 6171–7.
164. Vidal SM, Malo D, Vogan K, et al. Natural resistance to infections with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 1993; 73: 469–76.
165. Bellamy R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect* 1999; 1: 23–7.
166. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, et al. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 283-289.

167. Baker ST, Barton CH, Biggs TE. A negative autoregulatory link between Nramp1 function and expression. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 501–7.
168. Atkinson PG, Barton CH. High level expression of NRAMP1G169 in RAW264·7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport. *Immunology* 1999; 96: 656–62.
169. Kuhn DE, Baker BD, Lafuse WP, et al. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264·7 macrophage cell lines transfected with NRAMP-1 or NRAMP1 Asp169. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 113–9.
170. Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, et al. Natural-resistance-associated macrophage protein1 is an H⁺/ bivalent cation antiporter. *Biochem J* 2001; 354: 511–9.
171. Hackam DJ, Rotstein O, Zhang D, et al. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance associated macrophage protein 1 impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 1998; 188: 351–64.
172. Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, et al. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 2000; 192: 1237–48.
173. Vidal S, Belouchi AM, Cellier M, et al. Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. *Mamm Genome* 1995; 6: 224–30.
174. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482–8.
175. Andrews NC, Levy JE. Iron is hot: Update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* 1998; 92: 1845–52.
176. Wardrop SL, Richardson DR. Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6586–93.
177. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I like gene is mutated in Gly169 patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet* 1996; 13: 399–408.
178. Waheed AM, Parkkila S, Zhou XY, et al. Hereditary hemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12384–9.
179. Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, et al. Defective iron homeostasis in β 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med* 1996; 184: 1975–85.

180. Rothenberg BE, Volland JR. $\beta 2$ knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1529–34.
181. Koller BH, Marrack B, Kappler JW, et al. Normal development of mice deficient in $\beta 2$ m, MCHI proteins and CD8 + cells. *Science* 1990; 248: 1227–30.
182. TenElshof AE, Brittenham G, Chorney KA, et al. $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes drive tumor necrosis factor- α responsiveness to intestinal iron challenge: relevance to hemochromatosis. *Immunol Rev* 1999; 167: 223–32.
183. Brock JH. Lactoferrin. A multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol Today* 1995; 16: 417–9.
184. Mincheva-Nilsson L, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Activated human gamma delta T-lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand J Immunol* 1997; 46: 609–18.
185. Crouch SPM, Slater KJ, Fletcher J. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by iron binding protein lactoferrin. *Blood* 1992; 80: 235–40.
186. Hirahara F, Gorai I, Tanaka K et al. Cellular immunity in pregnancy: subpopulations of T lymphocytes bearing Fc receptors for IgG and IgM in pregnant women. *Clin Exp Immunol* 1980;41:353-357
187. Dhur A, Galan P, Preziosi P et al. Lymphocyte subpopulations in the thymus, lymph nodes and spleen of iron-deficient and rehabilitated mice. *J Nutr* 1991;121:1418–24.
188. Helyar L, Sherman AR. Moderate and severe iron deficiency lowers numbers of spleen T-lymphocyte and B-lymphocyte subsets in the C57/Bl6 mouse. *Nutr Res* 1992;12:1113–22.).
189. Mullick S, Rusia U, Sika M, et al. Impact of iron deficiency anaemia on T lymphocytes, their subsets in children. *Indian J Med Res* 2006;124:647-54.
190. Berger J, Schneider D, Dyck JL, et al. Iron deficiency, cell mediated immunity and infection among 6-34 month old children living in rural Togo. *Nutr Res* 1992; 12:39-49.
191. Zimmer JP, Garza C, Heler ME, et al. Postpartum maternal blood helper T (CD3+, CD4+) and cytotoxic (CD3+CD8+) cells: correlations with iron status, parity, supplement use and lactation status. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 897-904
192. Kemp JD. The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J Clin Immunol* 1993;13:81–92.
193. Santos PC, Falcao RP. Decreased lymphocyte subsets and K cell activity in iron deficiency anemia. *Acta Hematol* 1990; 84: 118-21.

194. Luraschi A, Borgotti P, Gioria A, et al. Determination of lymphocyte subpopulations, defined with monoclonal antibodies, in patients with iron deficiency anemia. *Minerva Med* 1991; 82 : 557-63.
195. Thibault H, Galan P, Selz F, et al. The immune response in iron deficient young children: effect of iron supplementation on cell mediated immunity. *Eur J Pediatr* 1993;152:120-4.
196. Attia MA, Essa SA, Nosair NA, et al. Effect of iron deficiency anemia and its treatment on cell mediated immunity. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2009; 25:70–7
197. Tsouchnikas I, Tsilipakou M, Daniilidis M, et al. Effect of iron loading on peripheral blood lymphocyte subsets and on circulating cytokine levels in iron-depleted hemodialysis patients receiving erythropoietin. *Nephron Clin Pract* 2007; 107 :97–102.
198. Sejas E, Kolsteren P, Hoeree T, et al. Iron supplementation in previously anemic Bolivian children normalized hematologic parameters, but not immunologic parameters. *J Trop Pediatr* 2008; 54 : 164 – 8
199. Keramati MR, Sadeghian MH, Ayatollahi H, et al. Peripheral blood lymphocyte subset counts in pre-menopausal women with iron-deficiency anaemia. *Malaysian J Med Sci* 2011; 18 : 38 – 44.
200. Liu W, Jiang A, Guo C. Cellular immunity in childhood iron deficiency anemia with recurrent respiratory infections. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 1997; 18: 566-7
201. Galan P, Davila M, Mekki N, et al. Iron deficiency, inflammatory processes and humoral immunity in children. *Int J Vitam Nutr Res.* 1988;58(2):225-30
202. Bagchi K, M. Mohanram, Reddy V. Humoral immune response in children with iron-deficiency anemia. *BMJ* 1980; 280; 1249-51
203. Hershko C, Vitells A, Braverman DZ. Cause of iron deficiency anemia in an adult inpatient population. *Blut* 1984;49;347-352
204. Warsch S, Byrnes J. Emerging causes of iron deficiency anemia refractory to oral iron supplementation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2013 Aug 6;4(3):49-53
205. Annibale B, Capurso G, Chistolini A, et al. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *Am J Med.* 2001 Oct 15;111(6):439-45.
206. Troncone R, Maurano F, Rossi M et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *Journal of Pediatrics* 1999;134;166-71.
207. Corazza GR, Valentini RA, Andreani ML, et al. Subclinical coeliac disease is a frequent cause of iron-deficiency anaemia. *Scand Journal of Gastro* 1995;30;153-156.

208. Çekin AH, Çekin Y, Sezer C. Celiac disease prevalence in patients with iron deficiency anemia. *Turk J Gastroenterol* 2012;23:490-495