

# ERİTROSİTLER VE HEMOGLOBİN METABOLİZMASI

## **Eritrositler**

Dolaşım sisteminde belirli bir süre kalan hücelere **kan hüceleri** adı verilmektedir. Eritrositler, içerdikleri hemoglobine O<sub>2</sub> bağlayarak taşıyan kırmızı renkli kan hüceleri'dirler. İnsan eritrositleri, çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedirler; çapları 6-9 µ, kalınlıkları merkezde 1 µ ve kenarlarda 2-2,5 µ kadardır. *Eritrositler erişkinlerin kemik iliğinde yapılırlar; toplam vücut ağırlığının %3-6 kadarını oluşturan kemik iliğinin yaklaşık yarısı eritrosit yapımında görev yapan eritropoietik hücelerdir. Eritropoietik hücelere ve dolaşımında bulunan eritrositlerin tümüne eritron adı verilir.*

İleri derecede özelleşmiş hücelere olan eritrositlerin %34 kadarı hemoglobin çözeltisidir. Eritrositlerde nükleus ve mitokondri, ribozom, lizozom, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı gibi subsellüler organeller bulunmaz.

Eritrosit membranı, 6 nm kalınlığındadır; %49 protein, %44 lipid, %7 karbonhidrat içerir. Eritrosit membranındaki lipidler, diğer memeli plazma hücelerinde olduğu gibi, hücre etrafında dayanıklı bir yapı oluşturmak üzere iki tabakalı bir yapı meydana getirmektedirler. İnsan eritrosit membran lipidlerinin %25'ini kolesterol, %60'ını fosfogliserid, %5-10'unu glikolipid, geri kalanını kolesterol esterleri, serbest yağ asitleri, sülfatidler, triaçilgliseroller oluşturur. Fosfatidil kolinin 2/3'ü ve sfingomiyelinin %80-85'i membranın dış yüzeyinde yer alır; fosfatidil serin ve fosfatidil etanolaminin %80-90'ı membranın iç yüzeyinde yer alır; kolesterol ve glikolipidler membranın dış yüzeyinde bulunurlar.

Eritrosit membranında iki tür protein bulunmaktadır. **İntegral proteinler** adı verilen proteinler, lipid tabakalarına sıkıca bağlanmışlardır; **ekstrinsik proteinler** adı verilen proteinler ise integral proteinlere kovalent olmayan bağlar ile bağlanan periferik proteinlerdir. Eritrosit membran proteinlerinden band 3 ve glikoforin, integral proteinlerdir; spektrin, band 4, aktin, ankrin ise periferik veya ekstrinsik proteinlerdir. İntegral proteinlerin polipeptit zincirleri, membranın her iki tarafında da görülür; bunların fonksiyonlarının O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> taşınmasıyla ve Cl<sup>-</sup> iyonlarının diffüzyonuyla ilişkili olduğu sanılmaktadır.

Eritrosit membranı, Cl<sup>-</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> gibi anyonlara geçirgendir; fakat Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> gibi katyonlara geçirgen değildir. Eritrositlerde K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> katyonları ile Cl<sup>-</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonları bulunur; en önemli katyon, K<sup>+</sup>dur. Eritrosit membranında hücre içi ile hücre dışı arasında iyon dengesini sağlayan pompa sistemleri bulunur; bu pompa sistemleri, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaz ve Ca<sup>2+</sup>ATPaz gibi enzimlerin etkisiyle çalışırlar.

Eritrositlerde karbonik anhidraz, katalaz, peptidaz, kolinesteraz, anaerobik glikoliz yolu ve pentoz fosfat yolu enzimleri bulunur.

Dolaşımdaki glutatyonun tamamı eritrositlerde'dir.

ADP, ATP ve NADP<sup>+</sup>, eritrositlerin önemli yapı taşlarıdır; inorganik fosfor ve 2,3-difosfogliserat da eritrositlerde önemli fosfor bileşikleridirler.

Eritrositlerin içindeki osmotik basınç, plazmadaki gibi %0,9'luk NaCl çözeltisinin osmotik basıncına eşittir ve bu durum izotonik olarak ifade edilir. Eritrositler hipertonic bir ortamda bulunurlarsa büzülerek küçülürler; hipotonik bir ortamda bulunurlarsa su alarak şişerler ve sonunda membranlarının bütünlüklerinin bozulmasıyla içerdikleri hemoglobin dış ortama dağılır ki bu durum **hemoliz** olarak tanımlanır. Eter, kloroform, safra tuzları, deterjanlar, yılan

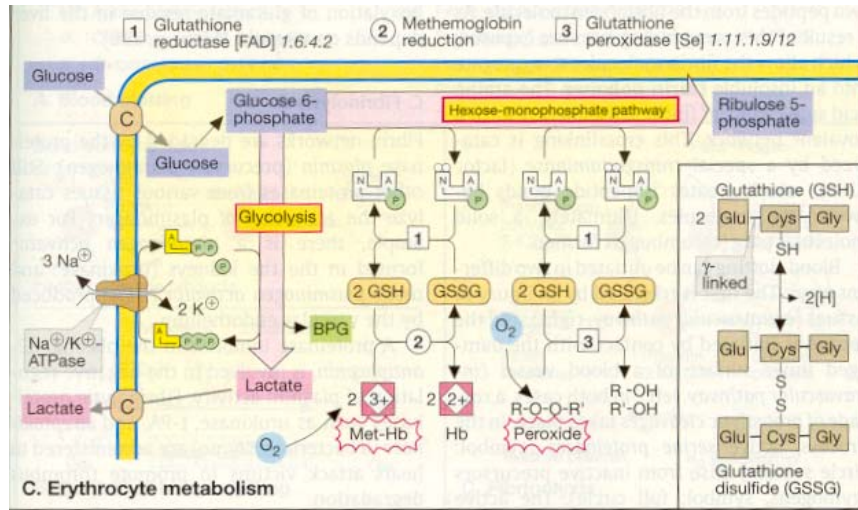
zehiri gibi bazı biyolojik toksinler, donma ve UV ışınları hemolize neden olurlar; patolojik durumlarda vücutta meydana gelen hemolizden sonra hemoglobinüri görülebilir.

### Eritrositlerdeki metabolik olaylar

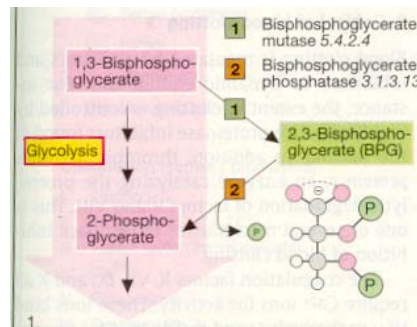
Eritrositlerde hemoglobin yapısındaki  $Fe^{2+}$  şeklinin korunması, düşük  $Na^+$  ve yüksek  $K^+$  düzeyinin sürdürülmesi, düşük  $Ca^{2+}$  düzeyinin sürdürülmesi, hemoglobin ve diğer proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonunun önlenmesi, eritrosit membran ve iskeletinin bütünlüğünün korunması için enerji gerekmektedir.

Eritrositlerde nükleus, mitokondri, ribozom, lizozom, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı gibi subsellüler organeller bulunmadığından protein ve nükleik asit sentezi yapılamaz, lipid metabolizması son derece kısıtlıdır.

Eritrositler, yaşamlarını korumak ve sürdürmek için gerekli enerjiyi glukozdan sağlarlar. Glukozun anaerobik glikoliz ve pentoz fosfat yolunda yıkılımı, eritrositlerin enerji gereksinimini karşılar:



Eritrositlerde glukozun %90 kadarı anaerobik olarak glikolitik yol ile yıkılır ki glukozun glikoliz yolunda yıkılımı sırasında pirüvat oluşur. Ancak eritrositlerde mitokondriyal sistemler bulunmadığından pirüvat, sitrat döngüsünde metabolize edilemez; laktik aside dönüşür. Eritrositlerde glukozun glikoliz yolunda yıkılması sırasında 2 ATP tüketilmekte ve 4 ATP oluşmaktadır ki böylece net kazanç 2 ATP olmaktadır. Eritrositlerde glikolitik yol, dokularda oksijenin hemoglobinden ayrılmasında önemli rol oynayan 2,3-bisfosfogliserat oluşumunun da en önemli kaynağıdır. Ancak glikolizin 2,3-bisfosfogliserat yapımında kullanılması, fosfogliserokinaz aşamasındaki ATP oluşumunun atlanmasına yol açar ve net ATP kazancı sıfır olur:



Eritrositlerde glikolitik yol, aynı zamanda NADH sağlar. Hemoglobinin oksijene bağlanması ve salıverilmesi sırasında hemoglobin yapısındaki iki değerlikli demirin üç değerlikli demire yükseltgenmesi ile methemoglobin oluşur; NADH, methemoglobin yapısındaki üç değerlikli

demirin yeniden kullanılmak üzere iki değerlikli demire indirgenmesinde görevli enzimler için gereklidir.

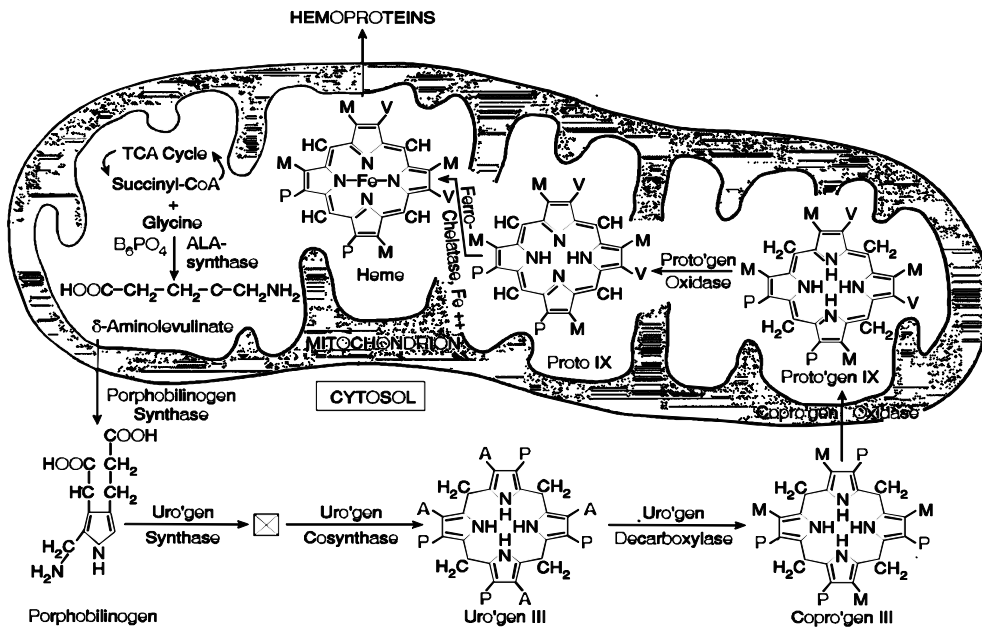
Glukozun pentoz fosfat yolunda yıkılımı sırasında NADPH oluşur. Hemoglobine oksijen bağlanması sırasında güçlü bir oksidan olan süperoksit anyonu oluşur. Son derece toksik olan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) de toksiktir; katalaz ve glutatyon peroksidaz etkisiyle etkisiz hale getirilir. Hidrojen peroksitin glutatyon peroksidaz etkisiyle etkisiz hale getirilmesi sırasında glutatyon (GSH) yükseltgenir ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) haline dönüşür. Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenerek yeniden kullanılabilir hale dönüşmesi için, pentoz fosfat yolunda elde edilen NADPH kullanılmaktadır. NADPH, methemoglobin yapısındaki üç değerlikli demirin yeniden kullanılmak üzere iki değerlikli demire indirgenmesinde de kullanılır.

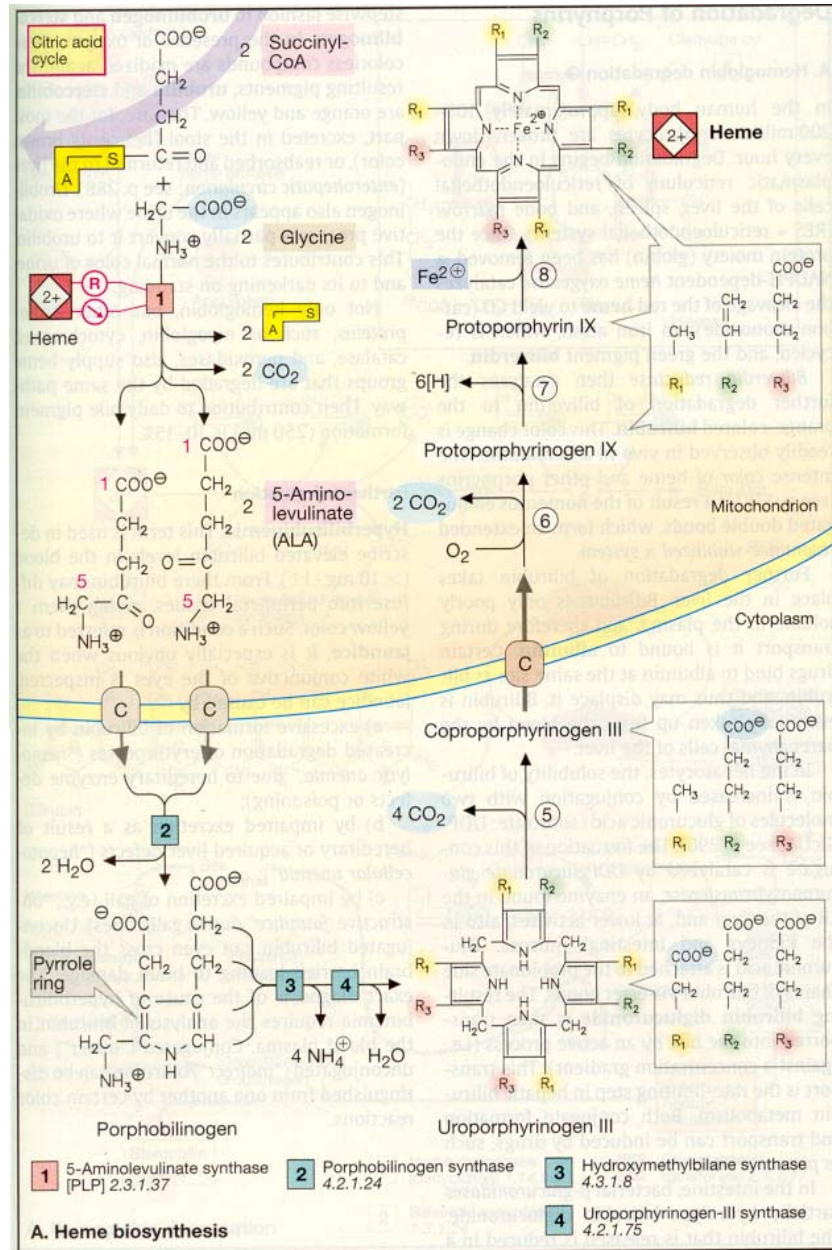
Eritrositlerin yaşlanmasıyla eritrosit membranındaki pompa sistemlerinin aktiviteleri azalır, iyon dağılımında değişiklikler olur; eritrosit içinde  $Na^+$  ve  $Ca^{2+}$  iyonları konsantrasyonu artarken  $K^+$  iyonu konsantrasyonu azalır. İyon dağılımındaki değişiklikler sonunda eritrositler parçalanırlar. Eritrositlerin ömrü, insanda ve köpekte yaklaşık 120 gün, ratta 100 gün kadardır. İnsanda her gün eritrositlerin 1/120'si retikuloendotelial sistemde parçalanmakta ve bunlardan 6,5-7 g kadar hemoglobin açığa çıkmaktadır.

### Porfirin ve hemoglobin biyosentezi

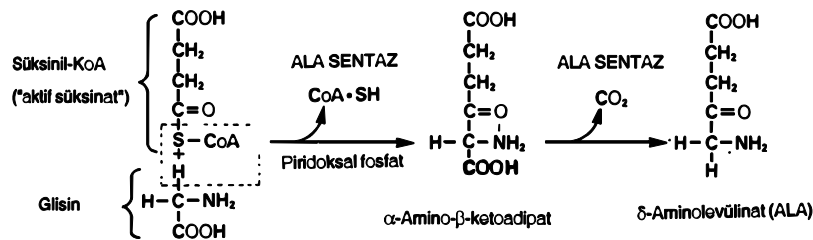
Porfirinler, amino asitlerden derivate moleküllerdir; porfirin biyosentezi için temel prekürsör, glisin amino asididir. İzotop çalışmalarıyla, porfirin halka sistemindeki metenil grupları karbonu, pirol halkalarındaki azot atomu ve bu azota komşu karbon atomlarından birinin glisinden sağlandığı gösterilmiştir.

Porfirin biyosentezi tüm hücrelerde olmakla birlikte en fazla eritrosit prekürsörü hücrelerde; organ olarak en fazla kemik iliğinde ve karaciğerde gerçekleşir. Porfirin biyosentezi kemik iliğinde hemoglobin sentezi amaçlı iken karaciğerde sitokromların sentezi için gereklidir. Porfirin biyosentezinde iki ana yol, porfirin halkası oluşumu ve yan zincirde modifikasyondur. Hem sentezinde ilk ve son üç reaksiyon mitokondride, diğerleri sitoplazmada gerçekleşir:



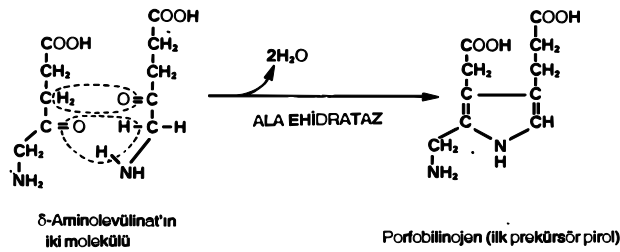


Porfirin biyosentezi için ilk reaksiyon, mitokondride glisin ile süksinil-KoA'nın,  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoasit üzerinden  $\delta$ -aminolevülinat (ALA) oluşturmak üzere reaksiyonlaşmasıdır. *Hemin organik bölümü, sekiz adet glisin ve süksinil-CoA'dan oluşur.* Bu ilk basamakta piridoksal fosfat (PLP,  $B_6PO_4$ ), glisin ile Schiff bazı oluşturur. Glisinin  $\alpha$  karbonunda oluşan karbanyon yapı, nükleofilik atak oluşumuna zemin hazırlar ve elektronsever molekül olan süksinil-CoA ile birleşim sağlanır;  $\delta$ -aminolevülinat (ALA) oluşur. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim, **ALA sentaz**dır:



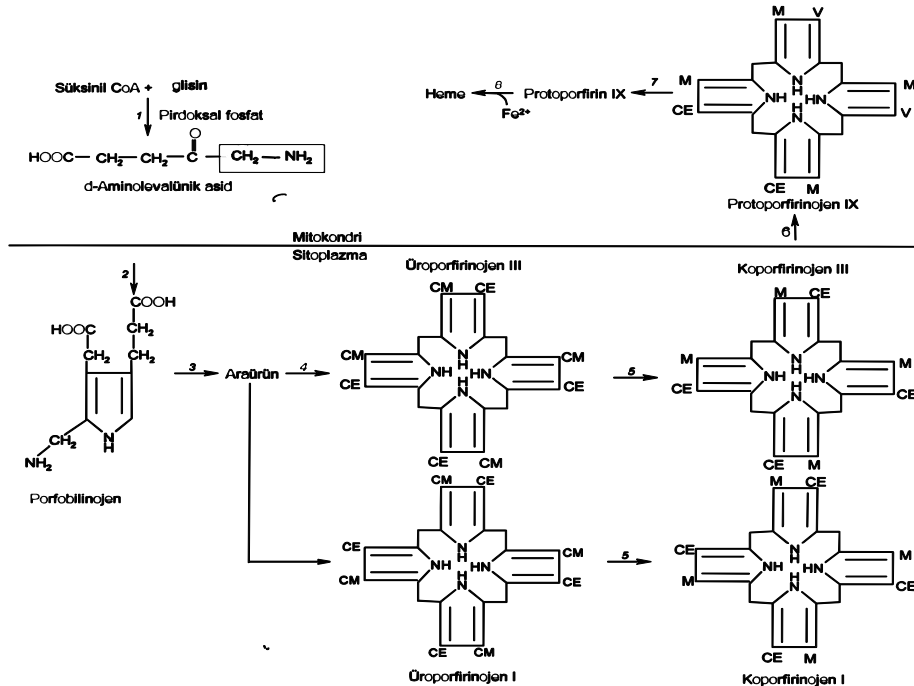
**ALA sentaz**, porfirin biyosentezinde hız belirleyici enzimdir. Bu enzimin sentezi de mitokondriyal DNA ile değil nükleustan gelen mRNA ile düzenlenmektedir. Enzim, dimer yapıdadır; her biri 71 kDa'lık alt ünite ve bazik N-terminal sinyal dizi içerir. Sinyal dizi, enzimi mitokondriye yönlendirir; şaparon protein olarak tanımlanan ATP'ye bağımlı 70 kDa'lık bir sitozolik komponent, ALA sentazı katlanmayan durumda tutar ve böylece enzim mitokondriyal membrandan geçer. Mitokondride, metal bağımlı bir proteaz tarafından N-terminal sinyal dizi koparılır; her biri 65 kDa olan alt üniteler oluşur. Mitokondriyal matriks içinde her biri 60 kDa'lık alt ünite içeren bir protein, ATP bağımlı ikinci bir işlevle proteinin doğru bir şekilde katlanmasını katalizler ve aktif nativ konformasyonda ALA sentaz oluşur. ALA sentazın yarı ömrü çok azdır; yaklaşık 60 dakika kadardır.

Mitokondride oluşan  $\delta$ -aminolevülinat (ALA), sitoplazmaya çıkar. Sitoplazmada, 2 molekül  $\delta$ -aminolevülinat (ALA), porfobilinojen (PBG) oluşturmak üzere kondense olur; reaksiyonu **porfobilinojen sentaz (ALA dehidrataz)** katalizler:



**ALA dehidrataz**,  $Zn^{2+}$  gerektiren sitozolik bir enzimdir; sülfhidril grupları içerir; ağır metallere inhibisyona çok hassastır. Kurşun ile zehirlenmelerde ALA miktarı artar.

Porfobilinojen (PBG) molekülü, propiyonat ve asetat takıları içerir. Dört molekül porfobilinojen, bir seri enzimatik reaksiyon sonunda protoporfirin IX (Protoporfirin III) oluşturur. Mitokondride oluşan protoporfirin IX'a (Protoporfirin III) mitokondri içinde ferro halinde demir ( $Fe^{2+}$ ) katılmasıyla "hem" oluşur:



**Hemoglobin sentez yolu:** Herbir biyokimyasal basamakta yer alan enzimler rakamla belirtilmiştir. 1, Ala sentaz; 2, Ala dehidrataz; 3, uroporfirinojen I sentaz; 4, Uroporfirinojen III sentaz; 5, Uroporfirinojen dekarboksilaz; 6, koproporfirinojen III oksidaz; 7, protoporfirinojen IX oksidaz; 8, ferroşelataz.

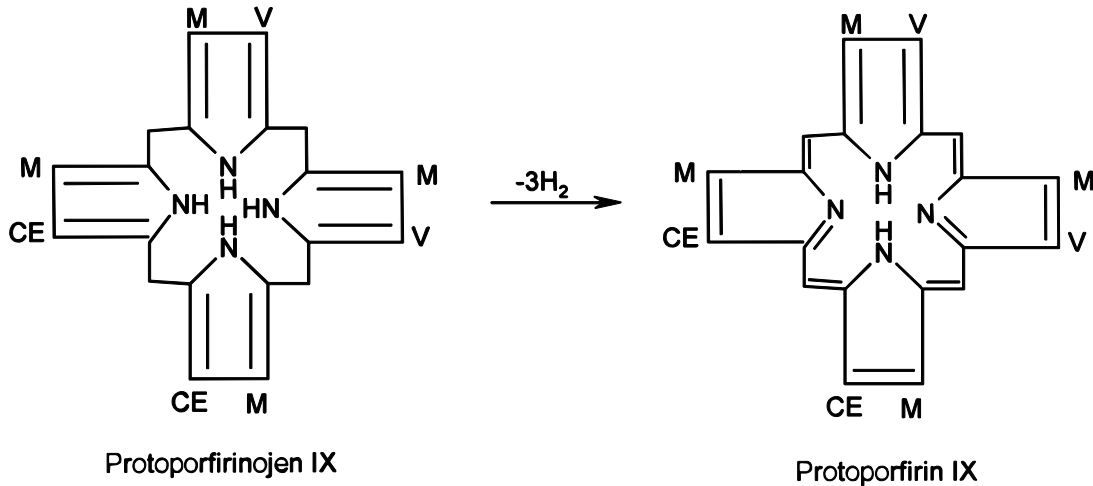
**Üroporfirinojen I sentaz**ın sülfhidril içeren grubu, PBG ile, deaminasyon sonucu tiyoeter bağı oluşturur; ardından 5 adet PBG birimi deamine olarak bağlanıp lineer heksapirol+enzim kompleksi oluşur. Bu yapı hidrolitik olarak parçalanıp enzim pirometan kompleksi ve lineer tetrapirrol (hidroksimetilbilan) oluşur. Enzim pirometan bileşiği, bir başka PBG ile yeni bir döngüye girer; pirometan kompleksi, enzime kovalent bağlı bir kofaktördür.

Üroporfirinojen I sentaz etkisiyle oluşan hidroksimetilbilan, iki farklı yolda değişime uğrar: 1) Enzim etkisi olmaksızın formülde bir kapanma ile Üroporfirinojen I (ÜRO I) oluşur. 2) **Üroporfirinojen III kosentaz** etkisiyle tip III izomer olan Üroporfirinojen III (ÜRO III) oluşur.

**Üroporfirinojen III dekarboksilaz**, yan zincirlere etki ederek ÜRO I ve ÜRO III izomerlerinin sırasıyla KOPRO I ve KOPRO III'e dönüşümlerini sağlar. Enzim, demir tuzlarıyla inhibe olur. Enzim ile ilgili tek gende anormallik, enzim aktivitesinde %50 düşme yapar; deri belirtileri ve ışığa hassasiyet ile karakterize **porfiriya kutanea tarda** denen klinik durum ortaya çıkar.

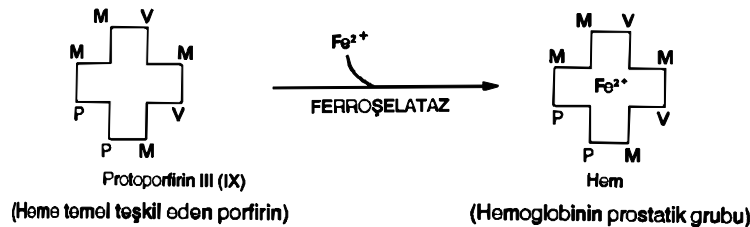
**Koproporfirinojen oksidaz**, mitokondriyal bir enzimdir; tip III izomerlere etki ederek koproporfirinojen III'den protoporfirinojen IX oluşturur. Enzim eksikliğinde, **herediter hepatik porfiriya** ya da **herediter koproporfiriya** denen klinik durum ortaya çıkar.

**Protoporfirinojen oksidaz** etkisiyle, protoporfirinojen IX'dan protoporfirin IX oluşur:



Protoporfirin IX'un suda çözünürlüğü, diğer hem prekürsörlerine göre çok azdır. Protoporfirinojen oksidaz enzimi eksikliğinde, **porfiriya variegata hastalığı** oluşur.

**Ferroşelataz**, aktivite için redükleyici ajanlara gereksinim gösterir; protoporfirin IX içerisine demir yerleşimini katalizler ve hem molekülü oluşturur:



Demir eksikliğinde çinko protoporfirin oluşur ki bu, parlak flüoresans vermesiyle ayırt edilir.

Mitokondride oluşan hem, mitokondri dışında, ribozomlarda sentez edilmiş olan globin ile birleşerek hemoglobin oluşturur:





70 kg'lık bir insanda günde 8 g hemoglobin sentezlenmekte ve yıkılmaktadır. Günlük porfirin sentezi 300 mg'dır ve sentez için  $\cong 30$  mg  $Fe^{2+}$  kullanılır.

Porfirin biyosentezi, hemoglobin gibi hem protein bileşiklerinin konsantrasyonu ile düzenlenir; hem protein bileşikleri, porfirin biyosentezinin ilk basamaklarına feedback inhibitör olarak etki ederler. **ALA sentaz** enzimi, porfirin biyosentezinde oran kontrol edici olarak rol oynar. Hem ve hemin, ALA sentaz ve ALA dehidratazı inhibe ederler. 100'den fazla ilacın ALA sentaz aktivitesini artırdığı da bilinmektedir.

Hemoglobin biyosentezinde pantotenik asit (vitamin B<sub>5</sub>), piridoksal fosfat (vitamin B<sub>6</sub>), vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit vitaminleriyle demir ve bakır elementleri gerekir. Pantotenik asit, koenzim A'nın yapısına katıldığı için; piridoksal fosfat, dekarboksilasyonda koenzim olduğu için ALA sentaz enziminin katalizlediği  $\delta$ -aminolevülinat (ALA) oluşumunda etkilidirler. Vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit, nükleoproteinlerin yapısına giren pürin biyosentezinde rol alırlar ki vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit eksikliğinde mitotik faaliyet azalır, kemik iliğinde az sayıda ve büyük eritrositler oluşur, pernisiyöz anemi ortaya çıkar. Demir, her hem molekülüne 1 adet  $Fe^{2+}$  olmak üzere bağlanarak hemoglobin oluşumuna katılmaktadır; demir eksikliğinde hipokrom anemi ortaya çıkar. Bakır, eritrositlerin olgunlaşmasında rol oynar ve bunların eritropoetik sistemden açığa çıkışlarını uyarır; bakır eksikliğinde kemik iliğinde olgunlaşmamış eritrositler artar.

İnsanlarda porfirin biyosentezinde görevli bazı enzimlerde genetik defekt olması, eritrositlerde, vücut sıvılarında, karaciğerde spesifik porfirin prekürsörlerinin birikmesine yol açar; **porfiriya**lar diye bilinen bazı genetik hastalıklar ortaya çıkar.

### Porfiriyalar

Porfiriya, genetik olarak tanımlanmış, hem sentezinde görevli enzimlerin fonksiyon bozukluklarıdır. Kongenital eritropoetik porfiriya hariç tüm porfiriya dominant kalıtılırlar. Fonksiyonel enzimi kodlayan tek gen vardır; porfiriyalarda %50 normal enzim aktivitesi gözlenir; kısmi defekt, hem sentez defektine neden olmaz ve anemi oluşmaz. Ancak defektli enzim gerisindeki porfirinler ve prekürsörleri vücut dokularında ve vücut sıvılarında birikir. Biriken bileşiklerin toksik yapısına bağlı olarak her bir porfiriya özgü semptom ve belirtiler ortaya çıkar. Kendiliğinden, alkol alınımı, kurşun gibi toksinler, östrojen ve oralkontraseptifler, ilaçlar etkisiyle başlayabilen **akut ataklarda** abdominal ağrı, konstipasyon, nöromüsküler belirtiler ve psikotik bozukluklar 1-2 günden birkaç haftaya kadar sürebilir; ALA ve PBG ekskresyonunda artış dikkat çekicidir.

Porfiriyalarda mide bağırsak yakınmalarından abdominal ağrı, en sık belirtidir; kabızlık, mide bulantısı ve kusma olabilir. Otonom sinir sistemi anormallikleri olarak taşikardi, hipertansiyon, terleme, idrar retansiyonu gözlenebilir. Periferik nöropati, ekstremitelerde ağrı, duyu azalma, kas zayıflığı, paralizisi, görme kaybı, felç, koma, ADH'un uygunsuz salınımı belirtileri ile ortaya çıkabilir.

Porfiriyaalar, semptomlara göre nörolojik porfiriya ve kutanöz porfiriya olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilirler.

### Nörolojik porfiriyaalar

Nörolojik porfiriyaalar, santral sinir sistemi ve deri tutuluşunun birlikte gözleendiği porfiriyaalardır.

**1) Akut intermittant porfiriya**, *porfobilinojen deaminaz* aktivitesinde bozukluğa bağı olarak ortaya çıkar. Akut intermittant porfiriya, en sık rastlanan porfiriya tipidir. Akut intermittant porfiriyaada hem sentezi azalır; porfirinler oluşmadığı için fotosensitivite olmaz.

Laboratuvar bulgusu olarak idrarda ALA ve PBG artar. Nonenzimatik kondensasyon ile idrarda az miktarda ÜRO oluşur. Fekal porfirinler normaldir.

**2) Porfiriya variegata**, *protoporfirinojen oksidaz* aktivitesinde bozukluğa bağı olarak ortaya çıkar. Porfiriya variegatada, PROTO ve KOPRO birikir; akut nörolojik atak ve fotosensitivite gözlenir.

Laboratuvar bulgusu olarak akut ataklarda idrarda ALA ve PBG artar.

**3) Herediter koproporfiriya**, *koproporfirinojen oksidaz* eksikliğine bağı olarak ortaya çıkar. Hastaların ancak 1/3'ünde fotosensitivite oluşur.

Laboratuvar bulgusu olarak feçeste PROTO ve KOPRO birikir.

### Kutanöz porfiriyaalar

Kutanöz porfiriyaalar, porfirinlerin deride aşırı derecede birikmesiyle karakterizedirler. Deride biriken porfirinler, 400 nm'de ışık absorplarlar ve yüksek enerjili duruma geçerler. Yüksek enerjili porfirinlerden oksijene enerji transfer edilir ve uyarılmış oksijen ürünleri oluşur. Uyarılmış oksijen ürünleri de hücrenel yapıları bozarlar. Moleküler ve hücrenel düzeydeki bu olayların sonucu olarak fotosensitivite ve deri lezyonları ortaya çıkar. Kutanöz porfiriyaalarda ALA ve PBG aşırı yüksek değildir.

**1) Kongenital eritropoetik porfiriyaada**, *ÜRO III kosentaz* aktivitesi düşüktür; tip III izomer yerine ÜRO I ve KOPRO I artışı olur. Kongenital eritropoetik porfiriya, otozomal resesif kalıtılır; erken çocukluk döneminde gözlenir. Kongenital eritropoetik porfiriyaada aşırı fotosensitivite olur; porfirin depolanmasına bağı olarak dişler kahverengi olur; hemolitik anemi ve splenomegali saptanır; prognozu kötüdür.

Yoğun miktarda ÜRO ve KOPRO atımına bağı olarak idrar pembe kırmızı olur. Fekal porfirinler artmıştır. Kan porfirinleri, normal değerin üzerine çıkar. Eritrositler, ÜRO ve KOPRO içerdiklerinden flüoresan mikroskop altında flüoresans verirler.

**2) Protoporfiriya**, *ferroşelataz*da kısmi defekte bağı olarak ortaya çıkar. Fotosensitivite, çocuklukta başlar; güneş ışığı altında yanıklar, kaşıntı, deride şişlik olur. Yüz ve el sırtı en fazla etkilenen bölgelerdir.

Laboratuvar bulgusu olarak yüksek miktarda PROTO ekskrete edilir; eritrosit serbest protoporfirinleri yüksektir; idrarda porfirin ve prekürsörleri normaldir.

**3) Porfiriya kutanea tarda**, *üroporfirinojen dekarboksilaz* aktivitesi düşüklüğüne bağı olarak ortaya çıkar. Ağır karaciğer hastalığı, alkolizm ve bazı ilaçlar semptomları başlatır; en sık görülen edinsel porfiriya türüdür; genelde yetişkin döneme kadar görülmez. Deride mekanik hasar oluşur; fotosensitivite gözlenir. Laboratuvar bulgusu olarak idrarda ÜRO ve 7 COOH'li porfirinler artar.



## Porfirin metabolizmasında sekonder bozukluklar

### Pb zehirlenmesi

ALA dehidrataz ve ferrozelataz aktiviteleri düşer. Eritrosit Zn protoporfirini yükselir. İdrarda ALA artar; PBG normaldir. Tanı için tam kanda Pb ölçümü yapılmalıdır.

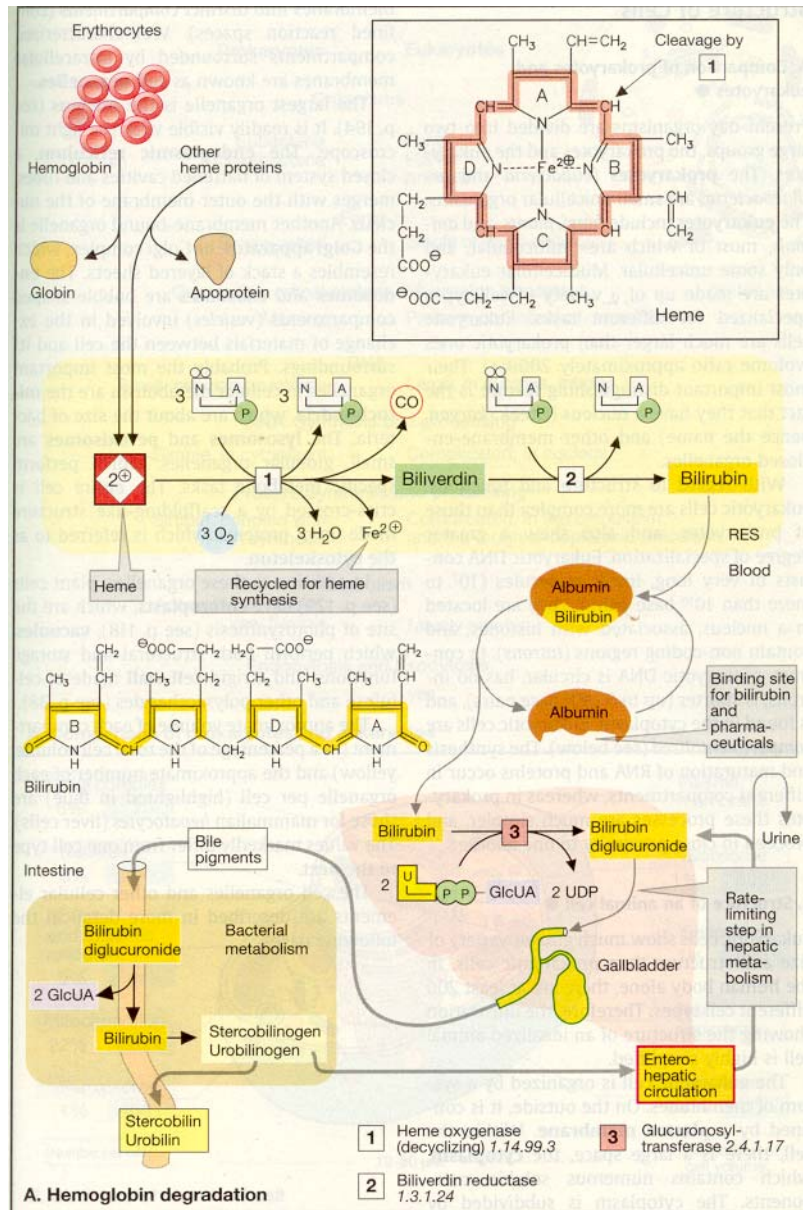
Hem prekürsörlerinin idrardaki normal değerleri şöyledir: PBG 0-2 mg/gün,  $\delta$ -ALA 1,3-7,0 mg/gün, üroporfirin < 40  $\mu$ g/gün, koproporfirin < 235  $\mu$ g/gün, protoporfirin 60  $\mu$ g/gün.

### Fe eksikliği

Zn protoporfirini yüksektir. Eritrosit serbest protoporfirini ölçmek, demir eksikliği için iyi bir tarama testidir. Tanı ve tedavi için ayrıca demir eksikliğine neden olan durumlar araştırılır.

### Hemoglobinin yıkılımı

Normal insan vücudunda her gün eritrositlerin parçalanmasıyla yaklaşık 6,5-7 gram kadar hemoglobin serbestleşmektedir. Eritrositlerin parçalanmasıyla serbestleşen hemoglobin, retikuloendotelial sistemde (RES) yani başlıca karaciğer, dalak ve kemik iliğinde yıkılır:

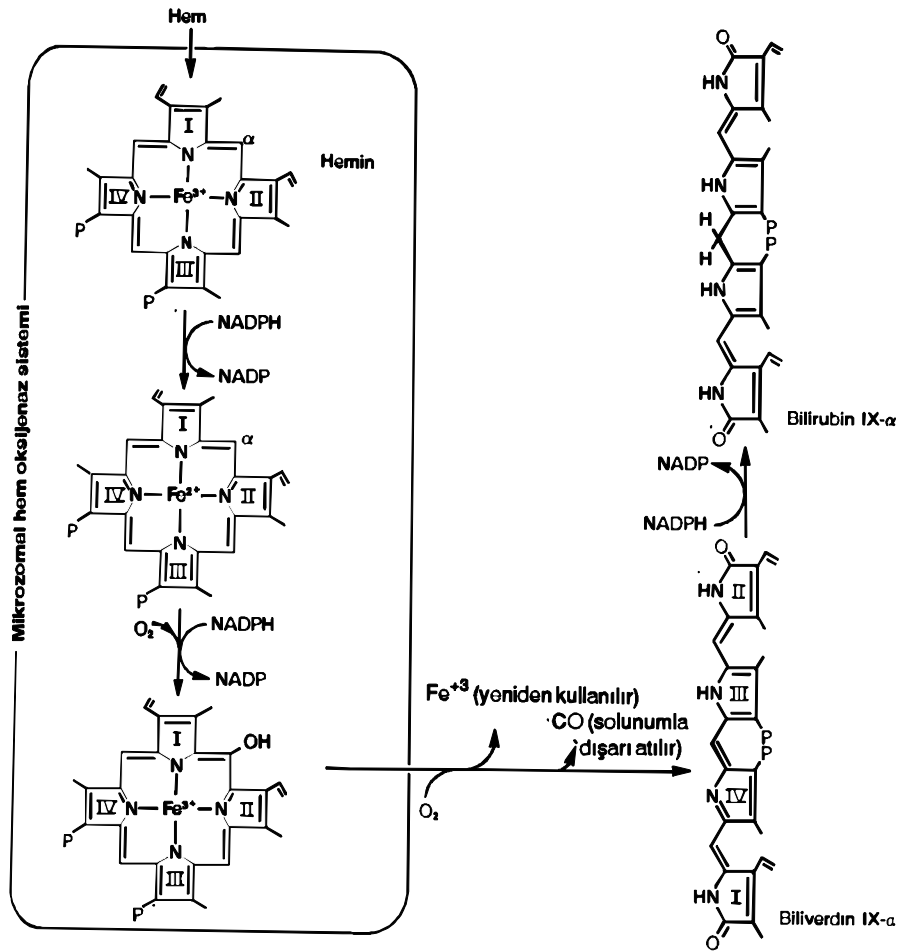


Böbrek, akciğer ve bağırsak, hemoglobin yıkılımında az çok rol oynar.

Hemoglobinin retikuloendotelial sistemde yıkılması sırasında meydana gelen biyokimyasal olayların başlangıç dönemi hakkında klasik teori ve Lamberg teorisi olmak üzere iki teori ileri sürülmüştür.

Hemoglobinin yıkılımı hakkındaki klasik teoriye göre önce hemoglobinden globin ayrılır ve "hem" serbestleşir; sonra hem'den  $Fe^{2+}$  ayrılarak protoporfirin meydana gelir; protoporfirinin porfin halkasının açılmasıyla yeşil renkli biliverdin oluşur; biliverdinin indirgenmesi sonucunda sarı veya turuncu renkli bilirubin oluşur.

Hemoglobinin yıkılımı hakkındaki Lamberg teorisine göre, hemoglobinden globin ayrılmadan önce hem kısmının porfin halkasındaki  $\alpha$ -metenil köprüsü, moleküler oksijen ( $O_2$ ), sitokrom p-450, flavoproteinler ve NADPH gerektiren mikrozomal hemoksijenaz sistemi tarafından parçalanır; biliverdin oluşur. *Tavşan eritrositlerinde, biliverdin,  $Fe^{2+}$  ve globin karışımından oluşan, koleglobin adı verilen yeşil renkli bir madde saptanmıştır.* Biliverdinin  $\gamma$ -metenil köprüsünün NADPH gerektiren biliverdin redüktaz tarafından indirgenmesiyle bilirubin oluşur:



Hemoglobinin hem kısmının bilirubine dönüşümü, yaklaşık 2-3 saatte gerçekleşir. Hemoglobinin yıkılmasıyla serbestleşen  $Fe^{3+}$ , ya retikuloendotelial sistemde depo edilir veya tekrar hemoglobin sentezine katılmak üzere transferrinle kemik iliğine iletilir; globin, protein depolarına katılır; bilirubin ise safra ile atılır.

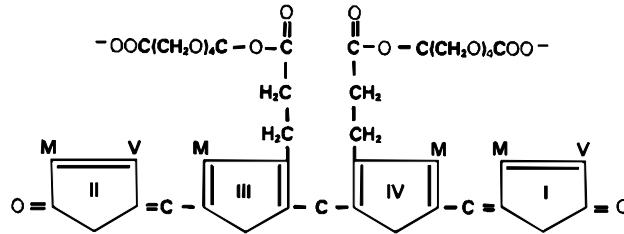
*Plazmada normalde %2-5 mg kadar bulunan serbest hemoglobin, karaciğerde sentez edilmiş olan ve glikoprotein yapısındaki haptoglobin ile kompleks oluşturur. Hemoglobin-haptoglobin kompleksi, karaciğer parankim hücreleri tarafından hızla tutularak dolaşımdan ayrılır. Aşırı hemolize bağlı olarak haptoglobinin hemoglobin bağlama kapasitesi aşıldığında*

bir miktar serbest hemoglobin karaciğer tarafından doğrudan alınabilir; fakat çoğu iki yol izleyebilir: 1) Serbest hemoglobin, iki  $\alpha\beta$  dimerine ayrılarak böbreklerden atılır veya bu dimerler haptoglobine bağlanır. 2) Serbest hemoglobin, methemoglobine okside olarak ferrihem ve globine ayrılır. Ferrihem, **hemopeksin** ile bağlanarak hemopeksin-ferrihem kompleksi oluşturur ve bu şekilde karaciğer parankim hücrelerine iletilerek karaciğerde yıkılır. Ferrihem'in bir kısmı, albümine bağlanarak methemalbümin oluşturur; daha sonra methemalbümindeki hem molekülü hemopeksine aktarılır.

Plazmadaki serbest hemoglobin için böbrek eşik değeri %70 mg'dır. Plazmadaki serbest hemoglobin düzeyi %70 mg'dan yüksek olursa, hemoglobin, oksihemoglobin veya methemoglobin şeklinde, albümine veya  $\beta$ -globuline bağlı olarak idrarla atılır. İdrarda hemoglobin bulunması, **hemoglobüri** olarak tanımlanır. Hemolitik anemilerde ve kongenital ahaptoglobinemide hemoglobüri görülebilir.

### Bilirubin

Bilirubin, hemoglobinin yıkılımı ile oluşan turuncu renkli safra pigmentidir:



İnsan kanında, parçalanmış eritrositlerden başka, kemik iliğinde gerçekleşen abortif hemoglobin sentezi ile oluşan hemoglobin, hemoglobin olmayan hemler, karaciğerde yıkılan miyoglobin, katalaz, peroksidaz, sitokrom b<sub>5</sub> ve sitokrom p-450 de bilirubin kaynaklarıdır.

Hemoglobinin hem kısmının yıkılmasıyla oluşan bilirubin, **indirekt bilirubin (ankonjuge bilirubin)** olarak bilinir. İndirekt bilirubin, Van den Bergh reaksiyonunda diazo reaktifi ile direkt reaksiyon vermez; ancak %50 etanol, kafein veya üre ile işlemden sonra reaksiyon verir. İndirekt bilirubin, suda çözünmez, idrara geçmez ve safra ile atılmaz. İndirekt bilirubin, liposolüblüdür; membranlardan kolaylıkla geçerek dokulara diffüze olabilir.

Karaciğer dışı retikuloendotelial sistem hücrelerinde meydana gelen indirekt bilirubin, genellikle albümine ve daha az olarak  $\alpha_1$  veya  $\alpha_2$ -globuline bağlanarak dolaşım yoluyla karaciğere taşınır. Her albümin molekülünde bilirubin için bir yüksek affinite yeri ve bir düşük affinite yeri vardır; plazmadaki yaklaşık %25 mg indirekt bilirubin, yüksek affinite yerinde albümine sıkıca bağlanabilir. Plazmadaki indirekt bilirubin %25 mg'dan fazla ise, yüksek affinite yerinde albümine sıkıca bağlanandan artı kalan bilirubin, albümine düşük affinite yerinde gevşek olarak bağlanır. Albümine düşük affinite yerinde gevşek olarak bağlanan bilirubin, kolaylıkla albüminden ayrılarak dokulara diffüze olabilir ki bebeklerde plazmada indirekt bilirubin %20-25 mg'dan yüksek olduğunda santral sinir sistemine geçerek **kern-ikterus** denen nöropatik tabloya neden olabilir. *Albüminin indirekt bilirubini bağlama kapasitesi bebeklerde %20-25 mg olduğu halde erişkinlerde %60-80 mg'dır; erişkinler indirekt bilirubin yüksekliğini daha iyi tolere ederler.* Asidoz, anoksi, serbest yağ asitleri yüksekliğinde indirekt bilirubinin albümine bağlanması azalır; bu durumlarda kern-ikterus oluşması kolaylaşır. Sülfonamidler, salisilatlar ve tiroit hormonları, albümin üzerindeki yüksek affinite yeri için bilirubinle yarışır ve kern-ikterus oluşumunu kolaylaştırırlar.

Kan dolaşımı yoluyla albümine bağlı olarak karaciğer dışı retikuloendotelial sistem hücrelerinden karaciğere gelen indirekt bilirubin, karaciğerde sinüzoidal plazmada albüminden ayrılır ve hepatositlerin sitoplazmasına geçer. İndirekt bilirubin, hepatositlerin

sitoplazması içinde Y ve Z adı verilen iki sitoplazma proteinine bağlanır. Y ve Z proteinleri, indirekt bilirubini düz endoplazmik retikulum mikrozomlarına taşırlar. İndirekt bilirubin, hepatositlerin düz endoplazmik retikulum mikrozomlarında mikrozomal bir enzim olan **UDP-glukuronil transferaz** enziminin katalizlediği bir reaksiyonda, glukozun glukuronik asit üzerinden yıkılımı yolunda oluşan UDP-glukuronik asitle tepkimeye girer; UDP serbestleşirken bilirubinin iki propiyonil takısından birinin glukuronik asidin yarı asetal hidroksili ile birleşmesiyle bilirubin monoglukuronid oluşur:



İkinci bir glukuronik asit, bilirubinin diğer propiyonil takısı ile esterleşirse bilirubin diglukuronid meydana gelir:



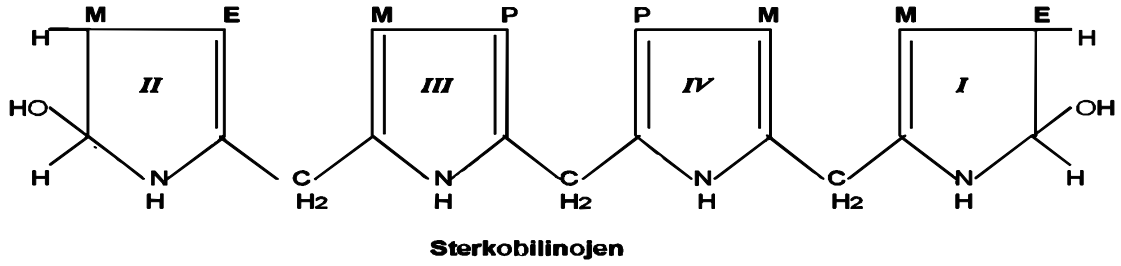
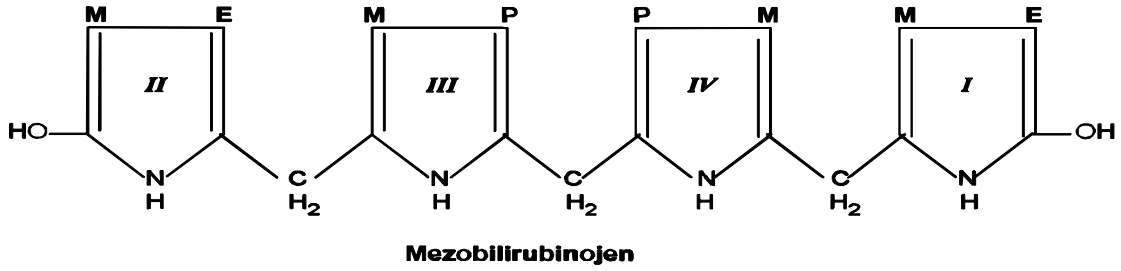
Bilirubinin glukuronik asit ile esterleşip bilirubin monoglukuronid veya bilirubin diglukuronid oluşturması, **bilirubinin glukuronik asitle konjugasyonu** olarak adlandırılır. Bilirubinin glukuronik asitle konjugasyonu sırasında çoğunlukla oluşan bilirubin diglukuroniddir; ancak karaciğer yetmezliğinde çoğunlukla bilirubin monoglukuronid oluşur.

İndirekt bilirubinin az bir kısmı, I ve II halkalarındaki hidroksil gruplarında sülfatla esterleşerek bilirubin sülfat oluşturur. İndirekt bilirubinin karaciğerde glukuronik asitle konjugasyonu veya çok az oranda sülfatlanmasıyla **direkt bilirubin (konjuge bilirubin)** oluşur. Direkt bilirubin, Van den Bergh reaksiyonunda diazo reaktifi ile direkt reaksiyon verir. Direkt bilirubin, suda çözünür ve safra ile atılır; liposolubl olmadığından lipid membranlardan geçemez ve kern-ikterus oluşmasında etkili olmaz. Direkt bilirubin normalde kanda bulunmaz veya çok az bulunur; ancak safra ile atılımının engellendiği durumlarda kanda artabilir ki kandaki düzeyi %1,5 mg'ı aştığında idrarda saptanır.

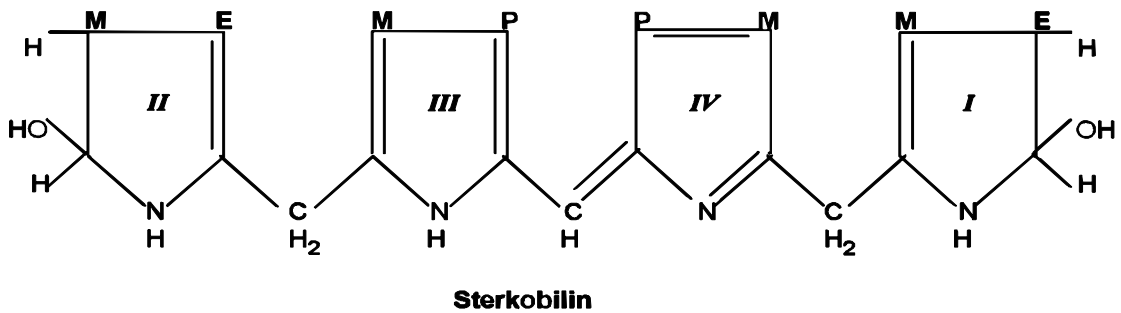
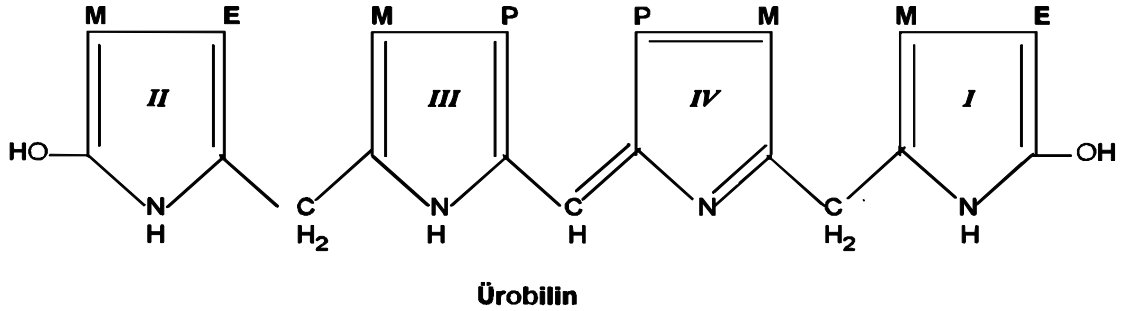
Hepatositlerde oluşan konjuge bilirubin (direkt bilirubin), hücrelerden safra kanaliküllerine ve safra kanaliküllerinden safra içinde bağırsağa atılır. Konjuge bilirubinin safraya atılması, geniş bir konsantrasyon gradientine karşı olur; bir aktif transport mekanizması tarafından yürütülür ki bu aktif transport, olasılıkla karaciğerin bilirubin metabolizmasının tümü için hız sınırlayıcıdır.

Safra ile bağırsağa günde 300 mg kadar atılan bilirubinin %85'i glukuronidlenmiştir, %10 kadarı sülfatlanmıştır, bir miktarı serbesttir, çok az miktarı şeker alkollerini ve asidik disakkaritlere bağlanmıştır. Bağırsaktaki konjuge bilirubinler, terminal ileumda ve çoğunlukla kalın bağırsakta bir  $\beta$ -glukuronidaz etkisiyle glukuronattan ayrılırlar. Glukuronattan ayrılan bilirubinin bir kısmı, bağırsaktan emilerek tekrar karaciğere gelir. Bağırsaktan emilerek karaciğere gelen bilirubinin bir kısmı safra ile tekrar bağırsağa atılır, bir kısmı ise karaciğerde doymamış yağ asitleri peroksitlerinin oluşumunu önleyici yani antioksidan olarak görev yaptıktan sonra bilinmeyen bir yoldan yıkılır. *Bağırsakta glukuronattan ayrılan bilirubinin bir kısmının emilerek karaciğere gelmesi ve karaciğerden safra ile tekrar bağırsağa atılmasına bilirubinin enterohepatik dolanımı* denir.

Bağırsakta glukuronattan ayrılan bilirubin büyük çoğunluğu çekumda ve özellikle sağ kolonda bulunan anaerobik bakterilerin enzimleriyle indirgenir ve **bilinojenler** veya **ürobilinojenler** denilen bir grup renksiz bilirubin ürünleri oluşur:



Ürobilinojenler, bilirubin indirgenmesiyle oluşmuş, renksiz bilirubin ürünleridir. Ürobilinojenler, bağırsaktan emilerek portal dolaşım yoluyla karaciğere gelirler. Karaciğere gelen ürobilinojenlerin büyük kısmı molekülünde bazı değişiklikler yapıldıktan sonra tekrar safra yoluyla bağırsağa atılırlar; çok az bir kısmı ise büyük dolaşıma geçerek idrarla dışarı atılır; anormal koşullarda, özellikle aşırı miktarda bilirubin oluştuğunda idrarda ürobilinojen artar. Ürobilinojenler, kolonda okside olarak **bilinler** veya **ürobilinler** denilen renkli bilirubin ürünlerini oluştururlar:



Ürobilinler, bilirubin bağırsakta indirgenmesiyle oluşan ürobilinojenlerin okside olmasıyla oluşan, renkli bilirubin ürünleridir. Ürobilin ilk defa idrardan sterkobilin ise ilk defa dışkıdan izole edildiklerinden bu isimleri almışlardır. *Hemolizin arttığı durumlarda, bağırsak florasının henüz oluşmadığı yeni doğan bebeklerde ve geniş spektrumlu antibiyotiklerle*

*bağırsak florasının tahribinde bilirubin, kolonda ürobilinojenlere ve sonra ürobilinlere dönüşmez; havanın moleküler oksijeni ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdine dönüşür.*

### Bilirubini tanımlama deneyleri

#### **Gmelin yöntemi ile bilirubinin tanımlanması**

Bilirubinin nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturması ve biliverdinden biliverdin oksidasyon ürünleri oluşması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 1 mL konsantre HNO<sub>3</sub> konur. Tüpteki konsantre HNO<sub>3</sub> üzerine 2 mL bilirubinli sıvı tabakalandırılır. Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluştuğu gözlenir.

*Açıklama:* Deneyde önce bilirubin, nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur; daha sonra biliverdin oksitlenerek biliverdin oksidasyon ürünleri oluşur. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, oluşan biliverdinden ileri gelmektedir, diğer renkler ise biliverdin oksidasyon ürünlerinden ileri gelmektedir.

#### **Rosin yöntemi ile bilirubinin tanımlanması**

Bilirubinin iyot ile yeşil renk oluşturması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 2 mL bilirubinli sıvı konur. Tüpteki bilirubinli sıvı üzerine 2 mL Rosin reaktifi (*Rosin reaktifi, %1'lik iyot-alkol çözeltisidir.*) tabakalandırılır. Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluştuğu gözlenir.

*Açıklama:* Deneyde bilirubin, ya iyot ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur ya da iyot ile bilirubinin birleşmesi sonucu yeşil renkli bir madde oluşmaktadır. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, biliverdinden ya da oluşan yeşil renkli iyot-bilirubin bileşiğinden ileri gelmektedir.

#### **Diazo reaksiyonu (Van den Bergh reaksiyonu) ile bilirubinin tanımlanması**

Bilirubinin diazo reaktifi ile kırmızı renkli azobilirubin bileşiği oluşturması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 5 mL bilirubinli sıvı konur. Tüpteki bilirubinli sıvı üzerine 1-2 mL taze diazo reaktifi (*Taze diazo reaktifi: 5 mL Diazo A çözeltisi ile 1 mL Diazo B çözeltisi karıştırılarak hazırlanır. Diazo A çözeltisi: 1 g sülfanilik asit ve 15 mL konsantre HCl, volüm 1000 mL'ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülür. Diazo B çözeltisi: %0,5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisi.*) eklenerek karıştırılır. Tüpteki karışımın kırmızı renk aldığı gözlenir.

*Açıklama:* Taze diazo reaktifinin hazırlanması sırasında, önce diazo A çözeltisindeki HCl ile diazo B çözeltisindeki NaNO<sub>2</sub>'ten HNO<sub>2</sub> ve NaCl oluşur; daha sonra HNO<sub>2</sub> ile sülfanilik asitten diazobenzosülfonik asit oluşur; taze diazo reaktifi, diazobenzosülfonik asit içermektedir. Deney sırasında, taze diazo reaktifindeki diazobenzosülfonik asit ile bilirubin arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli azobilirubin bileşiği oluşur. Gözlenen kırmızı renk, oluşan azobilirubin bileşiğinden ileri gelmektedir.

### İdrarda bilirubin arama deneyleri

#### **Rosin yöntemi ile idrarda bilirubin aranması**

Bir deney tüpüne tüpün 2/3'üne kadar idrar konur. Tüpteki idrar üzerine 2-3 mL Rosin reaktifi tabakalandırılır. Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır ve gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

İdrar ve Rosin reaktifi tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. İdrar ve Rosin reaktifi tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

#### **Gmelin yöntemi ile idrarda bilirubin aranması**

Bir deney tüpüne 2 mL konsantre HNO<sub>3</sub> konur. Tüpteki konsantre HNO<sub>3</sub> üzerine 1 mL idrar tabakalandırılır. Tüpte konsantre HNO<sub>3</sub> ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan



yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır ve gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Konsantre HNO<sub>3</sub> ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. Konsantre HNO<sub>3</sub> ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

#### **Fouchet yöntemi ile idrarda bilirubin aranması**

Bilirubinün FeCl<sub>3</sub> ve TCA ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin ve biliverdin oksidasyon ürünleri oluşturması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne 10 mL idrar konur. Tüpteki idrar üzerine 5 mL %10'luk BaCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenir ve karıştırılır; bir çökelti oluştuğu görülür. İkinci basamakta oluşan çökelti, karışımın filtre kağıdından süzülmesiyle filtre kağıdı üzerine alınır. Üzerinde çökelti olan filtre kağıdı, kuru bir başka filtre kağıdının üzerine konur. Filtre kağıdı üzerindeki çökelti üzerine 1-2 damla Fouchet reaktifi (*Fouchet reaktifi: 10 mL suda 2,5 g TCA çözülür ve bu çözeltiye %10'luk taze FeCl<sub>3</sub> çözeltisinden 1 mL eklenip karıştırılır.*) damlatılır ve Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır; gözlenenlere göre sonuç rapor edilir: Filtre kağıdı üzerindeki çökeltide Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluştuğu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. Filtre kağıdı üzerindeki çökeltide Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluştuğu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

*Açıklama:* BaCl<sub>2</sub>, idrardaki sülfat iyonlarını bağlayarak BaSO<sub>4</sub> şeklinde çöktürür. İdrarda bilirubin varlığında BaSO<sub>4</sub>, idrardaki bilirubini adsorbe ederek beraberinde çöktürür. Süzme sonucunda BaSO<sub>4</sub> ve adsorbe ettiği bilirubin filtre kağıdının üzerinde kalırlar. Filtre kağıdı üzerindeki çökeltiye Fouchet reaktifi damlatıldığında, çökeltideki bilirubin, Fouchet reaktifindeki FeCl<sub>3</sub> ve TCA ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin ve biliverdin oksidasyon ürünleri oluşturur.

#### **İdrarda bilirubin ürünlerini arama deneyleri**

##### **Ehrlich yöntemi ile idrarda ürobilinojen arama deneyi**

Ürobilinojenin Ehrlich reaktifi ile kırmızı renk oluşturması prensibine dayanır.

Bir deney tüpüne taze ve bilirubinsiz idrar konur. *Bilirubinli idrar, 10 mL'sine 5 mL %10'luk BaCl<sub>2</sub> eklenip karıştırıldıktan sonra süzülerek bilirubinsizleştirilir.* Tüpteki bilirubinsiz idrar üzerine 1 mL Ehrlich reaktifi (*Ehrlich reaktifi: 2 g p-dimetil aminobenzaldehid, 100 mL %20'lik HCl'de çözülerek hazırlanır.*) eklenip karıştırılır ve birkaç dakika beklenir. Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşup oluşmadığına bakılır:

Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşumu gözlenirse idrarda ürobilinojen artmıştır.

Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşumu gözlenmezse tüp ısıtılır. Isıtma sonucunda kırmızı renk oluşumu gözlenirse idrarda ürobilinojen normaldir. Isıtmaya rağmen kırmızı renk oluşumu gözlenmezse idrarda ürobilinojen (-)'dir.

*Açıklama:* İdrarda ürobilinojen varlığında; ürobilinojen, Ehrlich reaktifi ile kırmızı renk oluşturur.