

## SERBEST ERİTROSİT PROTOPORFİRİN İLE DEMİR EKSİKLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Muhittin A. SERDAR<sup>1</sup>, Süleyman CEYLAN<sup>2</sup>, İsmail KURT<sup>1</sup> Tolga AKKAN<sup>2</sup>, Taner ÖZGÜRtaş<sup>1</sup>,  
Y. Hüseyin TÜRKMEN<sup>1</sup>, Abdullah OLGUN<sup>1</sup>, Serkan TAPAN<sup>1</sup>, Türker KUTLUAY<sup>1</sup>

### EVALUATION OF IRON DEFICIENCY BY FREE ERYTHROCYTE PROTOPORPHYRIN

**Summary:** In this study, the measurements of free erythrocyte protoporphyrin (FEP), ferritin, transferrin saturation, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV) and red cell distribution width were performed in 467 individuals randomly selected in order to investigate the diagnostic value of FEP in the diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia. According to the results, 12 (3.3 %) males and 12 (13.3 %) females were diagnosed as iron deficiency anemia, and 25 men (9.5 %) and 35 women (27.7 %) were found iron deficient. Of those patients 4 were accurately diagnosed thalassaemia minor, and 5 had false high ferritin results. It was also evaluated that high sensitivity was found in ferritin measurements (91.7 %). And FEP values were determined close to ferritin values (88.3 %). Sensitivities of measurements of hemoglobin, MCV and RDW were ratherly found low with the values of 23.3 %, 25.0 % and 21.7 %, respectively. According to ROC analysis results, ferritin, and FEP values were so close to each other in the diagnosis of iron deficiency. It was also evaluated that FEP would ratherly be used for DE assessment in current screening studies of high population since ferritin was an acute phase reactant and cost too much for its measurement.

**Key Words:** Free erythrocyte protoporphyrine (FEP), iron deficiency and ferritin

**Özet:** Bu çalışmada demir eksikliği (DE) ve demir eksikliği anemisi (DEA) tanısında serbest eritrosit protoporfirin tanılma değerini araştırmak amacıyla sistematik rasgele örnekleme yöntemiyle seçilen 467 bireyde serbest eritrosit protoporfirin (SEP), serum ferritin, transferrin saturasyonu (TS), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit dağılım genişliği (RDW) ölçümleri yapıldı. Çalışma sonucunda, 12 erkek (%3.3) ve 12 kadın'a (%13.3) DEA tanısı konulurken 25 erkek (%9.5) ve 35 kadında (%27.7) DE saptandı. 4 anemik hasta, talasemi minör tanısı alırken, 5 kişide ferritinin yanlış yüksek olduğu tespit edildi. Sonuçlar incelendiğinde DE tanısında, en yüksek duyarlılık ferritin ölçümlerinde saptanırken (%91.7), SEP sonuçlarının ferritine yakın olduğu (%88.3) tespit edildi. Hb, MCV ve RDW testlerinin duyarlılıklarının ise oldukça düşük olduğu saptandı (sırasıyla %23.3, %25.0, %21.7). Yapılan ROC analiz sonuçlarına göre DE tespitinde ferritin ve SEP sonuçlarının oldukça yakın olduğu tespit edildi. Günümüzde, rutin olarak kullanılan ferritininin akut faz reaktan özelliği ve pahalı olması nedeniyle, DE değerlendirilmesi için geniş gruplardaki tarama çalışmalarında, SEP kullanımının daha uygun olacağı değerlendirildi.

**Anahtar Kelimeler:** Serbest eritrosit protoporfirin, demir eksikliği, ferritin.

### GİRİŞ

Vücut demir miktarının azalmasına bağlı gelişen, demir eksikliği (DE) ve anemisi (DEA), insanlarda

sık olarak gözlenmektedir (1,2,3). Yalnızca gelişmekte olan ülkelerde değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerde de, fizyolojik ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak, özellikle premenapozal

1 Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı,

2 Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı,



kadınlarda, %20'lere varan sıklıklarda rastlanmaktadır. Bu kadar sık görülmesine rağmen, demir eksikliği derecesinin saptanması amacıyla yapılan ileri tanısal laboratuvar çalışmaları oldukça pahalıdır. Bu nedenlerden dolayı, özellikle geniş tarama çalışmalarında daha ucuz ve kolay yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (2,4).

Demir eksikliği (DE) total vücut demir miktarında azalma ile karakterize klinik durumdur ve 3 derecede incelenmektedir. **Negatif demir balansı (Grade I):** Total demir miktarı azalmış, hemoglobin sentezi etkilenmemiştir. Kemik iliğinde hemosiderin azalmış, sideroblastlar normal ve serum ferritin düzeyi < 20 µg/L 'nin altındadır. **Demir eksikliği eritropoezisi (Grade II):** Hemoglobin düzeyi değişmemiştir. Normal hemoglobin sentezinde bozulmalar başlamıştır. Kemik iliğinde hemosiderin yok, sideroblastlar azalmış, serum ferritin düzeyi < 20 µg/L ve transferrin saturasyonu (TS) < %16 dir. **Demir eksikliği anemisi (Grade III):** İlave olarak hemoglobin konsantrasyonunda azalma ve eritrosit parametrelerinde değişimler ortaya çıkar. Bunlar özellikle ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit dağılım genişliğidir (RDW) (2).

Serbest eritrosit protoporfirin (SEP) ölçümü, demir eksikliğine bağlı olarak artmış olan eritrosit içi protoporfirin IX'un, doğal flüoresans özelliğinden yararlanılarak yapılmaktadır (4-9). Bu çalışmada, SEP, serum ferritin, demir, demir bağlama kapasitesi, TS, Hb, MCV ve RDW ölçümleri yapılarak, sağlıklı olduğu düşünülen popülasyonda demir eksikliğinin belirlenmesinde SEP'in tanısal önemi belirlenmeye çalışıldı.

#### MATERYAL ve METOD

Çalışma grubu Etimesgut Zırhlı Birlikler Okulu ve Eğitim Tümen Komutanlığında görev yapmakta olan Türk Silahlı Kuvvetleri personeli ve ailelerinden oluşturuldu. 840 personelden sistematik rasgele örnekleme yöntemiyle 367 erkek (15-54 yaşları arasında), 90 kadın (15-73 yaşları arasında), toplam 457 erişkin birey seçilerek çalışma yapıldı. Bilinen

kronik hastalığı bulunanlar ,hamileler ve 15 yaşından küçük çocuklar çalışma grubuna dahil edilmedi.

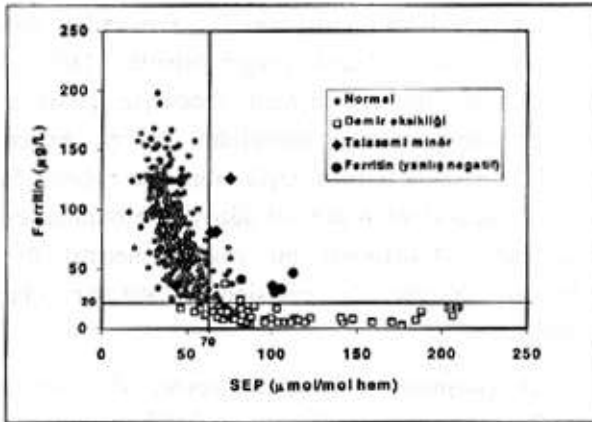
Çalışma grubundaki bütün bireylerde; eritrosit SEP, serum ferritin, TS ve tam kanda hemoglobin, MCV, RDW testleri yapılarak tanısal değerleri karşılaştırıldı. Tam kan, Coulter STKS cihazıyla (Coulter Electronic Ltd., England), ferritin ölçümleri immunotirbudimetrik (N Latex Ferritin, Behring, ABD) yöntemlerle ölçümleri yapıldı. SEP ölçümü için ise EDTA'lı kan örnekleri distile su ile 1:5 dilüe edilerek vorteksledi. Dilüe örnekten 100 µl üzerine 1 ml etil asetat ve asetik asit karışımı ( 4:1) ilave edildi ve tekrar vorteksledi. Karışım üzerine 1 ml 0.1 mol/L hidroklorik asit ilave edilerek santrifüj edildi ve süpernatanda Perkin Elmer LS50B florimetrede (Perkin Elmer Limited, U.K.) 408 nm eksitasyon (slit aralığı 5 nm) ve 607 nm emisyonunda (slit aralığı 20 nm) intensite ölçümü yapıldı. Seri hazırlanmış protoporfirin IX standartlarına göre konsantrasyonlar belirlendi ve hemoglobine bölünerek SEP konsantrasyonu hesaplandı (7). Serum demiri, kolorimetrik ferrozin yöntemi ile, demir bağlama kapasitesi ise demir-3-klorür ilavesi ve magnezyum sülfat çöktürme yöntemi kullanılarak ölçüldü (10).

Çalışma grubunda, ferritini (<20 µg/L) düşük bulunan bireylere demir eksikliği tanısı konuldu. Ayrıca ferritin değeri normal, SEP değeri 70 µmol/mol hemoglobin üzerinde ve TS <%16'nın altında olan vakalarda yanlış ferritin yüksekliği olduğu düşünülerek DE tanısı konuldu. Anemi tanısı konulan şüpheli vakalara da anemi tipinin belirlenmesi amacıyla hemoglobin elektroforezi (Helena Lab. USA) yapıldı. Vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit ölçümleri ise kemilüminesans yöntemiyle (DPC, Los Angeles, USA) yapıldı.

DEA tanısı konurken Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kriterleri kullanıldı (11). Hemoglobin değeri erkeklerde <13 gr/dl, kadınlarda ise <12 gr/dl altında olanlara anemi tanısı konuldu. İstatistik analizleri ve ROC eğrisi SPSS 10.0 for Windows programında yapıldı.

## SONUÇ

Çalışma grubundaki 457 erişkin bireyde ferritin, SEP, Hb, MCV ve RDW ölçüm sonuçlarına göre 367 erkeğin 12'sinde (%3.3) ve 90 kadının 12'sinde (% 13.3) DEA saptanırken, 25 (% 9.5) erkek ve 35 (% 27.7) kadında DE tespit edildi. Bütün vakalara ait SEP ve ferritin değerleri Şekil 1' de karşılaştırıldı. Bununla birlikte 4 (% 0.9) vakada talesemia minör saptanırken, vitamin B<sub>12</sub> ve folik asit eksikliği saptanmadı.



Şekil 1. Bütün bireylere ait serbest eritrosit protoporfirin (SEP) ve ferritin değerleri

Demir eksikliği saptanan 60 kişinin 5'inde (%8.3) ferritin sonuçları normal sınırlar içinde tespit edildi. Bu hastalarda DE tanısı SEP ve TS sonuçlarına göre tanı konuldu.

Çalışmada kullanılan bütün testlere ait duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü değerleri (PÖD) ve negatif öngörü değerleri (NÖD) Tablo I' de gösterildi. Seçilen eşik değerlere göre DE tanısında en duyarlı ve özgül testin ferritin ve daha sonra sırasıyla SEP, TS, MCV, Hb ve RDW olduğu saptandı (Tablo.I).

Tanısal testlerin birbirleri ile yapılan korelasyon çalışma sonuçlarına göre SEP'in DE saptanan grupta diğer laboratuvar testleri ile korelasyon göstermediği ancak bütün popülasyon göz önünde bulundurulduğunda ferritine oranla daha yüksek korelasyon gösterdiği tespit edildi (Tablo. II).

Tablo I: Tanıda kullanılan testlere ait duyarlılık, özgüllük, PÖD ve NÖD.

	Duyarlılık %	Özgüllük %	PÖD %	NÖD %
Ferritin	91.7	99.7	98.2	98.8
SEP	88.3	98.2	88.3	98.2
Transferrin saturasyonu	78.3	96.7	78.3	96.7
MCV	25.0	98.7	75.0	89.7
Hemoglobin	23.3	99.2	82.3	89.6
RDW	21.7	98.9	76.5	89.3

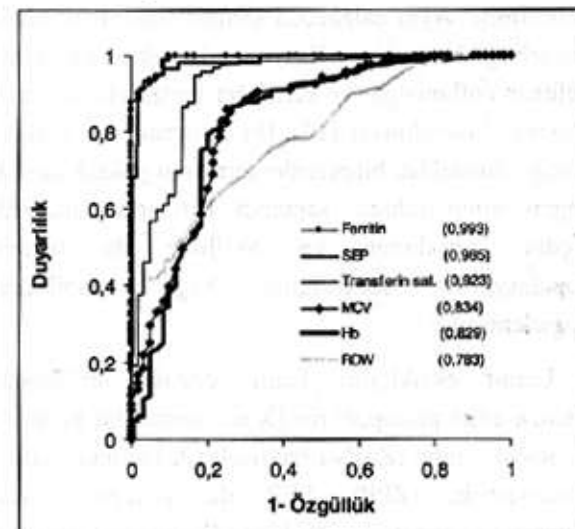
Tablo. II: Demir eksikliği tanısındaki kullanılan testlerin korelasyon analiz sonuçları

	SEP	FERRİTİN	Hb	MCV	RDW
TS	-0,449**	0,505**	0,331**	0,284**	-0,275**
SEP		-0,590**	-0,548**	-0,497**	0,608**
FERRİTİN			0,506**	0,351**	-0,330**
HB				0,481**	-0,404**
MCV					-0,547**

TS: Transferin saturasyonu

\* p<0,05, \*\* p<0,01

Yapılan ROC eğrisi ve analiz sonuçları da göz önüne alındığında DE'nin saptanmasında en uygun tanı testinin serum ferritin ölçümü olduğu, SEP değerlerinin de serum ferritin değerlerine yakın olduğu saptandı. TS'nun ise tanısal değerinin SEP'e oranla daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Demir eksikliğini değerlendirilmesinde testlere ait ROC eğrisi



## TARTIŞMA

Demir eksikliği anemisi yaşamın bütün dönemlerinde gözlenen ve en sık rastlanan anemi tipidir (1,11). Anemi tespitinde ilk basamak laboratuvar testi, hemoglobin ve eritrositle ilgili diğer parametrelerin ölçümüdür. Ancak bu testler, aneminin tespit edilmesinde kullanılmasına rağmen DE değerlendirilmesinde çok düşük duyarlılığa sahiptirler. Bu çalışmada da, hemoglobin, MCV ve RDW değerlerinin demir eksikliğini değerlendirilmesinde çok düşük duyarlılığa sahip oldukları tespit edildi (Tablo 1).

Anemiler arasında en sık görülen mikrositik anemilerin nedeninin belirlenmesinde, vücut demir depo göstergesi olan serum ferritin ölçümü kullanılmaktadır (1,2,3,5,7,12). Ancak ferritinin aynı zamanda akut faz reaktanı özelliği göstermesi, DE değerlendirilmesinde önemli bir dezavantaja neden olmaktadır (2,13). Bu çalışmada da DE tespit edilen 5 olguda ferritinin yanlış yüksekliğine bağlı tanısal yanlışlık saptanmıştır. Bu hastaların tanıları SEP ve TS ile konulmuştur. Wong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hastanede yatan hastalarda çinko protoporfirin ölçümlerinin, ferritin ve TS'dan daha yüksek duyarlılığa ve özgünlüğe sahip olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada serum ferritininin düşük duyarlılığı, hastane popülasyonunda yüksek oranlarda bulunan enflamatuvar ve karaciğer hastalıklarına bağlı olduğu belirtilmiştir (13). Bu çalışmada ise sağlıklı olduğu düşünülen bireylerde, ferritinin yüksek tanısal değere sahip olduğu saptandı. Bu farklılığın, SEP ölçüm metodunun ve özellikle de seçilen popülasyonun farklılığına bağlı olabileceği değerlendirildi.

Demir eksikliğine bağlı, bozulan eritropoez sonucu artan protoporfirin IX'un önemli bir kısmı (~ % 80-90) çinko (Zn)'ya bağlı olarak bulunur. Çinko protoporfirin (ZPP), SEP ile yüksek oranda korelasyon gösterir (6,14). Demir durumunun değerlendirilmesinde, ZPP ölçümü yapan cihazların kullanımı, önemli derecede tanısal kolaylık

sağlamıştır (2,5,13,14). Ayrıca kurşun toksisitesine bağlı ZPP artışının saptanması ve düzeylerinin serum kurşun düzeylerine paralellik göstermesi bu çalışmalara farklı bir boyut kazandırmış ve özellikle çocuklarda kurşun toksitesinin saptanması için tarama yöntemi olarak kullanılmıştır (15). 1978 den itibaren Amerika'da, CDC (The Centers for Disease Control) tarafından, kurşun toksisitesinin saptanmasında SEP ölçümlerinin kullanılması önerilmiştir (16).

SEP değerlerinin, demir eksikliğini özellikle demir eksikliği eritropoezisi evresinde arttığı bilinmektedir. Ancak serum ferritini, DE'in ilk evresinden itibaren düşmesi nedeniyle, patolojinin erken saptanmasında önemlidir. Bu çalışmada 5 (%8.3) hastada ferritin düşük olmasına rağmen SEP ve TS düzeylerinin normal düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada bu vakalar negatif demir balansı (Grade I) evresindeki vakalar olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada 457 erişkin bireyde, DEA tanısında SEP ile ferritin arasında belirgin fark olmadığı, ancak DE değerlendirilmesinde ferritinin daha yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahip olduğu saptandı. Zanelli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ferritin duyarlılığının %82, SEP'in ise %61 olduğu belirtilmiştir (17). Siegal ve arkadaşları ise ZPP duyarlılığını %81, Serdar ve ark. demir eksikliği olan çocuklarda ferritini %85, SEP'i ise %94 olarak saptamışlardır (6,18). Bu çalışmalar arasındaki önemli farklılıklarının nedenleri ise özellikle bu çalışmaların farklı tip anemisi olan hasta gruplarında yapılmış olması ve kronik hastalıklarının fazlalığıdır. Ancak bizim çalışmamız, toplumdan rastgele bir grup oluşturularak yapılmıştır.

Çeşitli araştırmacılar ferritin ile SEP veya ZPP arasında korelasyon saptamamışlardır. (2,14,18,19). Bu çalışmada da DE olan popülasyonda korelasyon saptanmazken demir eksikliği olmayan grupta ve total grupta istatistiki anlamlı korelasyon saptandı (Tablo. II).

Serum ferritini, demir eksikliğinin değerlendirilmesinde daha yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahip olması nedeniyle rutin olarak kullanılması rağmen, geniş popülasyon tarama çalışmalarında maliyeti önemli oranda arttırmaktadır. SEP ölçümü ise yeterli duyarlılıkta, pratik ve ucuz bir laboratuvar testidir.

Sonuç olarak, ferritinin akut faz reaktan özelliği göstermesi ve daha pahalı bir yöntem olması nedeniyle, SEP'in geniş ve özellikle hastane popülasyonlarında demir eksikliğinin taranmasında en uygun laboratuvar testi olduğu değerlendirilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Richard LG. In: Richard LG, Thomas CB, Foester CB, Athens J, Lukens J (Eds). (1993) Microcytosis and the anemias associated with impaired hemoglobin synthesis. Wintrobe's Clinical Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia. 791-807.
2. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, Hehlmann R. (1994) Central role of zinc protoporphyrin in staging iron deficiency. Clin Chem. 40: 768-773.
3. Cook JD, Finch CA, Smith N. (1976) Evaluation of the iron status of a population. Blood. 48:449-455
4. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, Reiter A, Hehlmann R. (1996) Laboratory tests of iron status: correlation or common sense? Clin Chem. 42: 718-724.
5. Hershko C, Konijn AM, Link G, Moreb J, Grauer F, Weissenberg E. (1985) Combined use of zinc protoporphyrin (ZPP), mean corpuscular volume and haemoglobin measurements for classifying microcytic RBC disorders in children and young adults. Clin Lab Haemat. 7: 259-269.
6. Siegel RM, LaGrone DH. (1994) The use of zinc protoporphyrin in screening young children for iron deficiency. Clin Pediatr. 33:473-479.
7. NCCL: The National Committee fo Clinical Laboratory Standarts. Etyrocyte protoporphyrine testing. Proposed guideline NCCLS document C42-P, 1995
8. Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, Zuckerman DM. (1977) The Hematofluorometer. Clin Chem. 23:270-274.
9. Labbe RF, Rettmer RL. (1989) Zinc protoporphyrin. A product of iron-deficient erythropoiesis. Semin Hematol. 26:40-46.
10. Cook JD.(1971) An evaluation of adsorption methods for measurement of plasma iron binding capacity. J Lab Clin Med. 76: 497
11. Dallman PR, Yip R, Oski FA. In: Nathan DG, Oski FA (Eds). (1993) Iron deficiency and related nutritional anemias. Hematology of Infancy and Childhood. WB Saunders Company, Philadelphia. Vol. 2: 413-450.
12. Hershko C, Bar-Or D, Gazieli Y, Naparstek E, Konijn AM, Grossowicz N, Izak G. (1981) Diagnosis of iron deficiency anemia in rural population of children. Relative usefulness of serum ferritin, red cell protoporphyrin, red cell indices, and transferrin saturation determinations. Am J Clin Nutr. 34:1600-1610
13. Wong SS, Qutishat AS, Lange J, Gornet TG, Maximilian Buja L. (1996) Detection of iron-deficiency anemia in hospitalized patients by zinc protoporphyrin. Clin Chim Acta. 224: 91-101.
14. Labbe RF. (1992) Clinical utility of zinc protoporphyrin. Clin Chem. 38: 2167-2168.
15. Patrick JP, Andrew AR, Azmat H: (1991) Observational study of erythrocyte protoporphyrin screening test for detecting low lead exposure in children: Impact of lowering the blood lead action threshold. Clin Chem. 37: 216-225.
16. Centers for Disease Control. Preventing lead poisoning in young children: a statement by the Centers for Disease Control [Report].Atlanta, GA:CDC.DHEW publication no.00-2629,1978
17. Zanella A, Gridelli L, Berzuini A, Colotti MT, Mozzi F, Milani S, Sirchia G. (1989) Sensitivity and predictive value of serum ferritin and free erythrocyte protoporphyrin for iron deficiency. J Lab Clin Med. 113:73-78.
18. Serdar MA, Sarıcı Ü, Kurt İ, Kurnaz L, Gökçay E, Kutluay T. (2000) The Role Of Erythrocyte Protoporphyrin in Diagnosis of Iron Deficiency Anemia of Children. The Journal of Thropical Pediatrics, Vol; 46: 323-326.
19. McLaren GD, Carpenter JD, Nino HV. (1992) Erythrocyte protoporphyrine in the detection of iron deficiency. Clin Chem. 38:2167-2168.