

DEMİR YÜKLEMESİNİN DOKU DEMİR DÜZEYLERİNE ETKİLERİ*

H. Oktay SEYMEN, Derviş ÖZÇELİK, Tefik GÜLYAŞAR,
Murat MENGİ, Pınar SEYMEN, Günnur YİĞİT

Background and Design.- The harmful effects of acute and chronic iron loading are well documented. Increased lipid peroxidation is an important expression of both chronic and acute iron toxicity. Our aim was to study the effect of iron overloading on the different tissue levels of iron. **Results.-** 14 adult male Wistar albino rats weighing 200-250g were used. The animals were divided into 2 weight-matched groups. Group 1: Control group (n=7) and Group 2: Iron overloading group (n=7). The rats in group 2 received intraperitoneal iron (Ferro III hydroxide polymaltose) at a dose of 250 mg/kg/day for 10 days. At the end of the administration period, the rats were anesthetized by ketamine (50 mg/kg). Heparinized blood samples were obtained via aorta abdominalis. The samples of the tissue from liver, heart, spleen, brain and skeletal muscle were obtained. The plasma and the tissue levels of iron were measured by atomic absorption spectrophotometer. The plasma free iron values for rats receiving iron were significantly ($p<0.001$) higher. This finding confirmed the establishment of the iron overloading state. The liver, heart, spleen, and skeletal muscle tissue levels of iron were significantly higher ($p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$ respectively) than those of control rats. There was no significant difference between two groups brain tissue levels of iron ($p>0.05$). **Conclusion.-** Our results show that the liver cells have the most capability of iron storage.

Seymen HO, Özçelik D, Gülyaşar T, Mengi M, Seymen P, Yiğit G. Effect of iron overloading on the tissue levels of iron. Cerrahpaşa J Med 1999; 30: 207-213.

Kan transfüzyonları, hemokromatozis ve bazı anemilerin tedavisi gibi durumlarda plazma demir konsantrasyonu yükselmektedir.¹ Çeşitli dokularda depolanma özelliği olan molekülün, yüksek konsantrasyonlarda hipertansiyona yol açtığı ileri sürülmüştür. Akut ya da kronik demir yüklemesinin zararlı etkilerini inceleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Yüksek doz demir, genellikle parankimal dokularda, retikülo-endotelial sistemin makrofajlarında ve en belirgin olarak da karaciğerde toplanır. Yüksek doz demire retikülositler ve eritrosit öncül hücreleri gibi hücrelerde de rastlanabilir. Yüksek doz demirin zararlı etkileri, öncelikle oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak ürün olmasıyla ilgili olabilir.² Haber-Weiss reaksiyonunda demir, hidrojen peroksit ve süperoksit moleküllerini toksik serbest hidroksi radikallerine dönüştürür.^{3,4} Lipid peroksidasyonunun artması hem akut hem de kronik demir toksisitesinin önemli bir özelliğidir. Kronik demir yüklemesinde lipid peroksidasyonunun artışı demir yüklenen deney hayvanları ve talasemik hasta organlarında gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarının yükselmesi olayın önemli bir göstergesidir.⁵ Demir yüklenen hayvanlarda solunumsal penton atımının ve dokularda konjuge dienlerin yükseldiği belirtilmektedir. Demir yüklemesi kısa süreli bir uygulama da olsa, aşırı konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunun arttığı kanıtlanmıştır. Bu etki in-vivo sıçan deneyleri, in-vitro hepatik mikrozomları ve insan lipozomlarında malondialdehit artışıyla gösterilmiştir.²

Demir, Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Doymamış yağ asitleri membran lipidlerinde bulunur ve peroksidasyona karşı duyarlıdırlar. Membran lipidlerinde peroksidasyon işlevi hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi reaktif maddelerin bir metilen grubundan hidrojen atomunu çıkarması ile olur.^{3,4}

Membran lipidleri ve proteinleri demire bağı peroksidatif hasara aşırı duyarlılık gösterir. Yüksek doz demir verilen sıçan hepatositlerinde demirin mitokondrielerde intrakristal depolandığı, matriks boşluğunda amorf yoğunluklu yapıların biriktiği ve mitokondriyumlarda şişme olduğu bildirilmiştir. Lipid peroksidasyonu mitokondriyumlarda hasar aynı zamanda kreps döngüsü enzimleri üzerinde de gerçekleşir. Mitokondrielerde belirtilen anomaliler elektronmikroskopu çalışmalarıyla da gösterilmiştir. Kronik demir yüklenmesinde dokularda büyük miktarda hemosiderin depolanır. Çoğu hücrelerin hemosiderini lizozomlarda bulunur. Lizozomal membranların haraplanması hidrolitik enzimlerin hücre içine salınmasına neden olur ve sonuç olarak hücre ölür. Lizozomal hemosiderin, demir toksisitesinden doğrudan sorumlu değildir. Lipozomlara veya normal karaciğer hemojenatlarına hemosiderinin eklenmesiyle lipid peroksidasyonunun başlamadığı gözlenmiştir. Lizozomal enzimlerin aktivitesinde azalma, lizozomal membranların kırılmasında belirgin bir artma, primer ve sekonder hemokromatosisli hastaların karaciğerinden elde edilen biyopsi materyallerinde gösterilmiştir.²

Kalp kasında hücre membranları ve sarkoplazmik membranlar ekstrasellüler sıvı ile doğrudan temas halinde bulunurlar. Membranların demir toksisitesinden aşırı etkilenmesi özellikle kolaylaşmaktadır. Ağır kronik demir yüklenmiş hastaların plazmalarında düşük moleküler ağırlıklı demir kompleksleri bulunmuştur. Bu nedenle fare miyokard hücrelerinde sarkolemma membranlarında kırılmaların, demire ve çevresel oksijen konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir.² Akut demir zehirlenmesinde toksik konsantrasyonlardaki demir, mitokondri ve sitoplazma membranını doğrudan etkiler. Hipotansiyon ve metabolik asidoz gibi birçok klinik görünüm bu organellerin hasarı ile bağlantılıdır. Aşırı demirin hücrelerde lizozomal depolanması ve hızlanmış ferritin sentezi saatler içinde hücre savunma mekanizmaları olarak aktif olaylarla gerçekleşir.⁶ Kronik demir yüklenmesinde hücreler için koruyucu bu mekanizma, çok uzun sürdüğünde yeterli olmayabilir. Lizozomlarda demir büyük miktarlarda hemosiderin olarak depo edilir ve peroksidatif hasar kısmen başlar.

Aterosklerozis, arter duvarında düz kas hücrelerinin proliferasyonu, lipidlerin depolanması ve endotel hücre hasarı ile damarda kalınlaşmaya yol açan dejeneratif bir süreçtir. Aterogenezisde patofizyolojik görünüm serbest radikaller ve oksitlenmiş lipidlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir.⁷⁻⁹ Yüksek kolesterolü besinlerle beslenen sıçanlarda demir yüklemesi aterosklerotik lezyonların gelişimini artırmıştır. Avusturyalı araştırmacılar, 840 kişilik (40 ile 70 yaşları arasında) bir çalışmada serum ferritin konsantrasyonları ile ateroskleroz arasında bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı grup, ferritin artışı ile serum kolesterolü artışı arasında benzer ilişkiyi göstermiştir.¹⁰

Araştırmamız, demir yüklemesi yapılan deney sıçanlarında, demir birikiminin yoğunlaştığı dokuları saptamak amacıyla planlandı. Çünkü, daha önce yaptığımız demir uygulamalı çalışmalarımızda, demirin oksidan stress faktörü olduğu, plazmada MDA'nin çok anlamlı artışıyla saptanmıştı.⁵ Demirin ortaya çıkardığı zararlı oksidatif etkinin demir birikimi olan dokularla ilişkisi üzerinde duruldu. Oksidatif olayların arttığı demir yüklemesi durumunda karaciğer, kalp, iskelet kası, dalak ve beyin dokusunun incelenmesi planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Wistar-Albino 14 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol (n=7) ve demir yüklemesi yapılan grup (n=7) olarak ikiye ayrıldı. Oksidatif stres oluşumu, on gün süreyle intraperitoneal Ferro III polimaltoz (250 mg/kg/gün) uygulanarak sağlandı.^{5,11} Süre sonunda ketamin hidroklorür (50 mg/kg) anestezisi altında abdominal aortadan çeşitli kan parametreleri tayini için kan örnekleri ayrıca doku demir düzeylerini saptamak amacı ile karaciğer, kalp, dalak, kas ve beyin dokusu örnekleri alındı. Alınan örneklerde atomik absorpsiyon

spektrofotometresi (Shimadzu AA-680) ile Fe+2 düzeyleri ölçüldü. Atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle ölçümde; alınan doku örnekleri yaş ağırlık olarak tartılıp, temiz cam santrifüj tüpleri içerisine yerleştirildi. Üzerlerine 1 ml derişik nitrik asit eklenerek toplam hacmin yarısı kalana kadar 100°C de çeker ocaktaki etüde bekletildi. Örnekler etüden çıkarılıp soğumaları beklendi ve üzerlerine 1 ml derişik perklorik asit ilave edilerek tekrar etüve kondu. Yine toplam hacmin yarısı kalıncaya kadar etüde bekletildi. Bu işlemten sonra etüden çıkarılan örneklerin üzerine bidistile su konularak hacim 5 ml ye tamamlandı ve böylece spekrofotometrede ölçülebilir hale getirildi. Ölçüm için Titrosol 1000(0,002 mg (Merck) standart stok solusyonundan 1 ve 2 µg/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı. Kör olarak bidistile su kullanıldı. Alette elemente ait özel dalga boyunda ışık veren HCL (Hollow Cathod Lamp) lambaları ile yine ölçülecek elemente uygun hava-asetilen gaz karışımı, slit aralığı, HCL ve BGC (Back Ground Correction) modları seçildi. Bu şartlarda kör ve standart çözeltiler alete (Shimadzu AA-680) verilerek kalibrasyon eğrisi çizdirildi ve alınan örnekler ölçüldü.

Kontrol ve deney grubu hayvanlarında ölçülen parametrelerin istatistiksel değeriendirilmesi microstat istatistik programı kullanılarak Student's-t testi ile yapılmıştır. Anlamlılık sınırı olarak p<0,05 alındı.

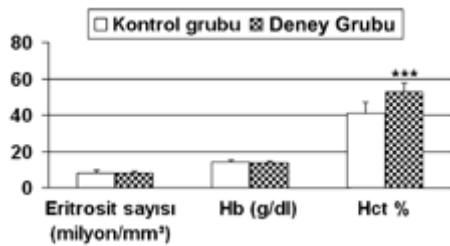
BULGULAR

Bulgularımıza Tablo I'de topluca bakıldığında; plazma demir konsantrasyonu kontrol grubuna göre çok yüksek bulunan (p<0,001) sıçanlarda, demir yüklemesinin amaca uygun şekilde artış yaptığı saptandı. Kan değerleri; eritrosit ve Hb açısından anlamlı bir farklılık göstermezken, %Hct değerlerinin demir yüklenen grupta yükseldiğini (p<0,001) kanıtlıyordu (Şekil 1,2).

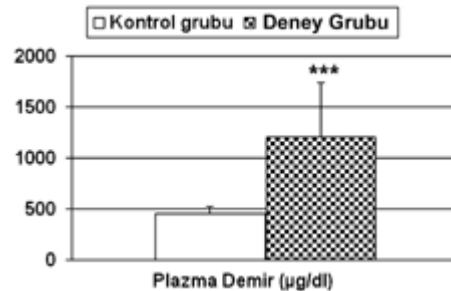
Tablo I. Kontrol ve Deney Gruplarında Ölçülen Parametreler ve Değerleri (Ort±SD)

	Kontrol Grubu M±SD	Deney Grubu M±SD
Eritrosit Sayısı (x10 ⁶ /mm ³)	8,09±8,34	8,34±0,96
Hb (g/dl)	14,32±1,04	13,83±0,61
Hct %	41,14±6,03	52,86±5,01***
Plazma Fe kons. (µg/g)	459,58±64,16	1207,71±529,26***
Karaciğer Fe kons. (µg/g)	396,79±86,35	1095,38±185,40***
Kalp Fe kons. (µg/g)	336,32±115,35	482,03±77,01**
Dalak Fe kons. (µg/g)	959,16±200,43	1135,44±171,01*
İskelet kası Fe kons. (µg/g)	157,22±58,61	293,73±154,20*
Beyin Fe kons. (µg/g)	82,68±24,64	104,73±39,52

(*)p<0,05, (**)p<0,01, (***)p<0,001



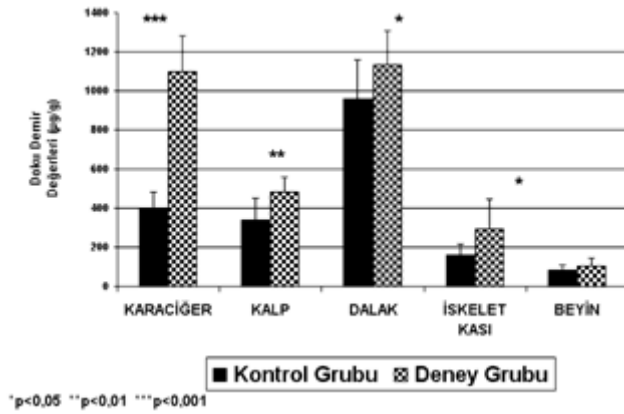
Şekil 1. Deney gruplarında eritrosit sayısı, Hb ve Hct% değerleri. *** p<0.001



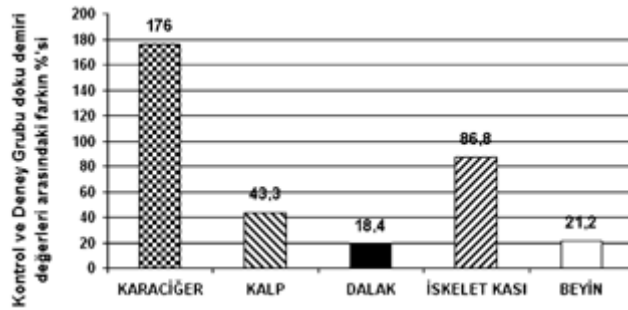
Şekil 2. Deney gruplarında plazma demir düzeyleri *** p<0.001

Dokularla ilgili bulgular; kontrol ve deney gruplarında en yüksek demir konsantrasyonu dalak dokusunda bulundu (Şekil 3). Bu bulgu dalağın demir tutma kapasitesiyle açıklandı. Kontrol grubuyla deney grubunun dalak dokusu demir konsantrasyonları karşılaştırıldığında, aradaki farkın sadece %18,4 oranında ve az anlamlı olduğu (p<0,05) anlaşıldı. Bulgumuz demir

yüklenmesinde dalak kapasitesinin yetersizliğini düşündürdü. Karaciğer demiri, kontrol ve deney grubunda konsantrasyon olarak ikinci sırayı alıyordu. Ancak gruplar arası karşılaştırmada, deney grubundaki demirin kontrole göre % farkı %176 oranında yüksek ve çok anlamlı bulundu ($p<0,001$). Bu bulgu demir yüklemesinde karaciğerin yüksek kapasitesini kanıtlıyordu. Kalp kası, demiri en fazla içeren üçüncü doku olarak saptandı. Kalp kasında ölçülen demir düzeyleri kontrol ve deney grubunda %43,3 oranında anlamlı ($p<0,01$) farklılık gösterdi. Demirli grupta kalp kasında bulunan demir fazlalığı, iskelet kaslarında çok daha yüksek oranda (%86,8) bulundu. Ancak farkın anlamlılığı ($p<0,05$) daha düşüktü. Beyin dokusundaki demir düzeyleri ise kontrol ve deney grupları arasında farklılık göstermedi (Şekil 4).



Şekil 3. Kontrol grubu ve demir yüklemesi yapılan deney grubunun doku demir değerleri



Şekil 4. Gruplar arası eser element fark %leri

TARTIŞMA

Eser elementlerin dokularda birikimi çeşitli fizyolojik fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Biriken metallerin hangi mekanizmalarla bu bozukluklara neden olduğu çoğu araştırmancının konusunu oluşturmaktadır. Demir birikimine bağlı hastalık tabloları, en çok araştırılan ve rapor edilen bilgiler arasındadır. Son yıllarda hipertansiyon risk faktörü olarak demirin zararlı oksidan özelliğiyle ilişkisi üzerinde durulmuştur. Finlandiya'da yapılan bir araştırmada yüksek demir alan kişilerde hipertansiyon riskinin artmış olduğu bildirilmektedir.¹² Gerçekte demirin oksidan sistem açısından önemi ilk kez 19. yüzyıl sonlarında Fenton tarafından ortaya konmuştur. Ancak Oksidan / Antioksidan dengesinin önemi son yıllarda daha çok anlaşılmakta ve bir çok yayın yapılmaktadır.^{7-10,13,14}

Araştırmamız demir uygulanan grupta plazma demir konsantrasyonunun çok yüksek bulunmasıyla ($p<0,001$) deney modelinin başarılı şekilde oluşturulduğunu kanıtlıyordu.

Kontrol ve deney grubundaki sıçanların eritrosit sayıları ve Hb düzeyleri arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı. Bu durumda demir uygulamasıyla, eritropoietik bir uyarının olmadığı anlaşıldı. Buna karşın deney grubunun %Hct değeri kontrol grubuna göre çok anlamlı ($p<0,001$) artışın varlığını gösterdi. Bu bulgu eritrositlerde demir reaksiyonlarına bağlı bir değişimin olabileceğini düşündürdü. Bu değişim membranlarda gelişen lipid peroksidasyonu ile ilgili olabilirdi. MCV değerleri yükselen demirli grupta Hct artışı yüzey hacim değişimleriyle ilgili olmalıydı. Bu konunun açıklanması amacıyla bir başka deney serisi oluşturularak oksidan olaylara bağlı kandaki hemoreolojik özelliklerin incelenmesi planlandı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre demir en fazla karaciğer dokusunda depolanmaktadır ($p<0,001$). Yüksek dozda demirin karaciğer hücrelerinde büyük hasar yaptığını gösteren enzim çalışmalarımız sürmektedir. Kalp dokusunda birikimin anlamlı düzeyde olması da ilginçtir. Bu sonuç kardiyovasküler sistem fizyolojisi açısından son derece önemlidir. Aynı zamanda hipertansiyon açısından da değerlendirilmelidir.

RES'in bir parçası olan dalakta da demir birikiminde kontrole göre anlamlı bir artış vardır ($p<0,05$). Bu olay bağışıklık sistemi gibi bir koruma mekanizmasının aktif hale geçtiğini ve demir elementinin fagositozunun artmış olduğunu düşündürmektedir.

Deney grubunda iskelet kaslarında gözlenen demir birikiminin, kontrole göre anlamlı artışı ($p<0,05$), reaktif oksijen ürünlerinin yüksek miktarlarda açığa çıkabileceğini göstermektedir. İncelemeyle incelenen hayvanlarda devinim azalmasının nedeni de oksidan sistemin aktifleşmesi olabilir. Beyin dokusu açısından demir birikimine baktığımızda, kontrole göre demir yüklenen grupta istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$). İntraperitoneal veya oral yoldan, maksimal dozun üzerinde demir uygulanması durumunda, demirin beyin dokusuna geçişinin kan-beyin setti tarafından engellendiği kanısındayız. Sonuç olarak diyebiliriz ki, yüksek dozda verilen demir, çeşitli doku ve organlarda birikime uğramaktadır. Bu birikim doku ve organların fizyolojik fonksiyonlarını değiştirebilir.

ÖZET

Kan transfüzyonları, hemokromatozis ve bazı anemilerin tedavisi gibi durumlarda plazma demir konsantrasyonu yükselir. Çeşitli dokularda depolanma özelliği olan molekülün oksidatif olayları artırdığı ve yüksek konsantrasyonlarda hipertansiyona yol açtığı ileri sürülmektedir. Bu araştırmada, demir yüklemesi durumunda zararlı etkileri bilinen demirin farklı dokularda karaciğer, kalp, iskelet kası, dalak ve beyin dokusundaki düzeylerinin incelenmesi planlanmıştır. Çalışmada Wistar-Albino 14 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol ($n=7$) ve demir yüklemesi yapılan grup ($n=7$) olarak ikiye ayrıldı. Demir yüklemesi ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumu, on gün süreyle intraperitoneal Ferro III polimaltoz (250 mg/ kg/ gün) uygulanarak sağlandı. Süre sonunda sıçanlara ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ile anestezi yapıldı. Abdominal aortalarından heparinli kan örnekleri, doku demir düzeylerini saptamak amacı ile karaciğer, kalp, dalak, kas ve beyin dokuları alındı. Alınan örneklerde atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Shimadzu AA-680) ile demir düzeyleri ölçüldü. Bulgularımıza göre, ikinci gupta %Hct değeri, plazma demiri ve karaciğer demirindeki artışlar istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($p<0,001$). Kalp dokusu demiri deney grubunda anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,01$). Dalak ve iskelet kası demir birikimi ise az anlamlı

olarak yüksekti. Beyin dokusu demir birikimi açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p<0.05$). Sonuç olarak diyebiliriz ki, yüksek dozda verilen demir, çeşitli doku ve organlarda farklı düzeylerde birikime uğramakta, demir depolama kapasitesi en fazla karaciğer dokusunda olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Miller M, Hutchins GM. Hemochromatosis, multiorgan hemosiderosis, and coronary artery disease. JAMA 1994; 272: 231-233.
2. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Sem Hematol 1989; 26: 277-285.
3. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet 1994; 334: 721-724.
4. Agil A, Fuller CJ, Jialal I. Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. Clin Chem 1995, 41: 220-225.
5. Seymen O, Seven A, Hatemi S, Hatemi H, Candan G, Yiğit G. Lipid peroxidation in experimental hyperthyroidism: effects of iron supplementation. Med Sci Res 1995; 23: 695-696.
6. Moore M, Folsom AR, Barnes RW, Eckfeldt JH. No Association between serum ferritin and asymptomatic carotid atherosclerosis. Am J Epidemiol 1995; 141: 719-723.
7. Salonen JT. Body iron stores, lipid peroxidation and coronary heart disease. Iron nutrition in health and disease, Chapter 29. John Libbey & Company Ltd. 1996; 293-301.
8. Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, Makuc DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. N Eng J Med 1994; 330: 1119-1124.
9. Witztum JL. The Oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 1994; 344: 793-795.
10. Steinberg D et al. Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. Circulation 1992; 85: 2338-2343.
11. Seymen O, Seven A, Candan G, Yiğit G, Hatemi S Hatemi H. The Effect of iron supplementation on GSH Levels, GSH-Px, and SOD activities of erythrocytes in L-thyroxine administration. Acta Med Okayama 1997; 51: 129-133.
12. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela Hh, Tuomilehto J, Seppanen, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. Circulation 1992; 86: 803-811.
13. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. N Eng J Med 1994, 331: 1159-1160.
14. Ascherio A, Willentt WC, Rimm EB, Giovannucci EL, Stampfer MJ. Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. Circulation 1994; 89: 969-974.

-
- *Anahtar Kelimeler:* Oksidan stres, Demir yüklemesi, Doku demir düzeyleri; *Key Words:* Oxidant stress, Iron overloading, Tissue iron levels; *Alındığı Tarih:* 7 Ocak 1999; Doç. Dr. Hakkı Oktay Seymen, Uzm. Bio. Murat Mengi, Prof. Dr. Günnur Yiğit: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı; Dr. Derviş Özçelik, Uzm. Fiz. Tefik Gülyaşar: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı; Dr. Pınar Seymen: TC Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Hastanesi 2. Dahiliye Kliniği; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. HO Seymen, Barbaros Mah. Sedef Sok. Onur Sitesi Çınar Apt. 9/23 Koşuyolu, Üsküdar, İstanbul, 81150.