

Demir Sükroz Ve Demir Dekstran'ın Sıçanlarda Periferik Kanda Lenfosit Dağılım Ve İşlevleri Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması

COMPARISON OF THE EFFECTS OF IRON SUCROSE AND IRON DEXTRAN ON DISTRIBUTION AND FUNCTIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD IN RATS

Mehmet SERT¹, Halil ATEŞ², Zahide ÇAVDAR³, Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ³, Aslı ÇELİK⁴, Caner ÇAVDAR⁵, Mehmet Ali ÖZCAN², Taner ÇAMSARI⁵

¹İsparta Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları, Nefroloji Bölümü

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı

⁵Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, demir sükroz ve demir dekstranın sağlıklı sıçanlarda lenfosit dağılımı ve işlevleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Yöntemler: Çalışmaya 18 Wistar albino sıçan alındı. Sıçanlar, kontrol (Serum fizyolojik; SF) (n=6), Demir Sükroz (DS) (n=6) ve Demir Dekstran (DD) uygulanan grup olmak üzere 3'e ayrıldı. 1 ml/kg SF, 10 mg/kg DS ve DD, intravenöz yol ile sırasıyla kontrol, DS ve DD gruplarına verildi. Akım sitometrik ve biyokimyasal analizler için enjeksiyon öncesi ve enjeksiyondan sonra 3., 6. ve 24. saatlerde kan örnekleri alındı.

Bulgular: Sitotoksik T lenfosit yüzdesinde, DS grubunda kontrol grubuna göre 6. ve 24. saatlerde anlamlı artış saptandı. T helper lenfositlerde, CD4+/CD8+ oranında, aktive T lenfosit (CD3+/CD25+), antijen sunan hücre ve B lenfosit yüzdesinde ayrıca IFN- γ seviyesinde ise DS grubunda kontrol ve DD grubuna göre anlamlı olarak düşme saptandı. Demir ve transferrin saturasyonu, DS grubunda, DD ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

Sonuç: Sağlıklı sıçanlarda yapılan bu çalışma sonucunda demir sükrozun demir dekstrana göre lenfosit dağılımını ve fonksiyonunu daha fazla olumsuz olarak etkilediği saptanmıştır. Bununla birlikte sayılan etkiler kısa süreli etkiler olup sonuçların kliniğe yansıtılabilmesi için bu demir preparatlarının daha düşük dozlarda ve uzun dönem etkilerini inceleyen çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Demir sükroz, demir dekstran, lenfosit, immünite

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to compare the effects of iron sucrose and iron dextran on the distribution and function of peripheral lymphocytes in healthy rats.

Methods: 18 Wistar albino rats were divided into three groups. Group 1: control, group 2: iron sucrose and group 3: iron dextran group. Saline, iron sucrose and iron dextran were given as 1 ml/kg and 10 mg/kg intravenously to control, iron sucrose and iron dextran group, respectively. Peripheral blood samples were collected before injection and at 3, 6 and 24 hours after injection for flow cytometric and biochemical analysis.

Caner ÇAVDAR
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD
Nefroloji BD
35340 İncirli, İZMİR

Results: The percentage of T suppressor lymphocytes in iron sucrose group showed significant increase at 6 and 24 hours, compared to control group. The percentage of T helper lymphocytes, activated T lymphocyte (CD3+/CD25+), antigen presenting cells and B lymphocyte, the ratio of CD4+ to CD8+ and IFN- γ level were found to be significantly decreased in iron sucrose group, compared to control and iron dextran group. Iron and transferrin saturation levels were significantly higher in iron sucrose group than others. **Conclusion:** This study showed that, iron sucrose, compared to iron dextran, had a negative effect on distribution of lymphocytes in healthy rats. These data support the development of further studies examining the effects of these iron preparations at low dosage and long duration on the effects of lymphocyte subpopulation.

Keywords: Iron sucrose, iron dextran, lymphocyte, immunity

Anemi, Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY) bulunan hastalarda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir (1). SDBY'li hastalarda aneminin en sık nedeni demir ve eritropoietin eksikliğidir. Ancak anemi ile mücadele ederken demir tedavisi ile immün sistemde bozukluklar geliştiği ve bunların sonucunda enfeksiyonlara eğilim olduğu bilinmektedir.

Demirin hem doğal bağışıklık sistemi hem de edinsel bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etkileri olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Demir yüklemesinin nötrofillerin kemotaksisini, fagositoz ve hücre içi öldürme kapasitesini azalttığı, makrofaj işlev bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir (2-4). Ayrıca demir kullanımı T helper lenfositlerin (CD4+) sayısını azaltarak ve T supressor lenfositlerin (CD8+) sayısını arttırarak hücresele immüniteyi zayıflatmaktadır (5,6).

Sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücrelerin kültüründe demir glukonat, demir sükroz ve demir dekstran'ın (25, 50 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lenfosit dağılımına (CD4+, CD16+, CD40+ ve CD56+) etkisini inceleyen bir çalışmada demir sükroz ve demir glukonatın demir dekstran ile karşılaştırıldığında CD4+ ve CD16+ hücreleri daha fazla azalttığı bildirilmiştir (7). Demir Sükroz (DS) ve Demir Dekstran'ın (DD) bağışıklık sistemi üzerine etkileri kısmi ve ayrı ayrı araştırılmış olmasına karşın lenfosit dağılımının birçok basamağı üzerine olan etkilerini araştıran ve ayrıntılı karşılaştıran bir çalışma yoktur.

Demirin immünite üzerindeki olumsuz etkisi serbest demir ile açıklanmaktadır. Küçük yapıdaki demir molekülleri daha hızlı demir açığa çıkarmakta ve plazmadan daha çabuk uzaklaşmaktadır (8). Demir dekstran, demir sükroza göre daha büyük çekirdeğe ve kılıfa sahiptir. Bu nedenle

demir dekstran'ın demir sükroza göre serbest demir oluşturması daha az olduğu için immün sistem üzerine toksisitesinin de sınırlı olduğu düşünülmektedir.

İlgili kaynakların bulgularına dayanarak çalışmamızın hipotezi, demir dekstran'ın demir sükroza göre lenfosit dağılımı ve işlevi konusunda daha az olumsuz etkiye sahip olabileceğidir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney Hayvanları

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile yapılmıştır. Çalışmada, ağırlıkları 300–350 gram arasında değişen 18 adet, yetişkin erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanlar standart kafesleme koşullarında, 3'lü kafeslerde standart yemleme ve su ile 2 günlük çalışma dönemi süresince barındırıldı. Çalışma süresi 2 gün olarak belirlendi. Sıçanlar, her grupta altı sıçan (n=6) olacak şekilde Serum Fizyolojik (SF), Demir Sükroz (DS) ve Demir Dekstran (DD) uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrıldı: Kontrol grubuna kuyruk veninden 1ml/kg SF yavaş puşe verildi. DS grubuna 10 mg/kg demir sükroz (Venofer®, Abdi İbrahim İlaç San ve Tic A.Ş. İstanbul, Türkiye); DD grubuna 10 mg/kg demir dekstran (Cosmofer®, Say İlaç, Edirne, Türkiye) yavaş puşe verildi. Her sıçana yapılan enjeksiyon zamanı kaydedildi. Akım sitometri ve biyokimyasal analizler için enjeksiyon öncesi ve enjeksiyondan sonra tüm gruplardan 3., 6. ve 24. saatlerde periferik kan alındı.

YÖNTEMLER

Sıçan Lenfosit Alt Gruplarının Akım Sitometrik Analizi

Demir preparatlarının lenfosit dağılımına etkisini değerlendirmek için toplam lenfosit, toplam T lenfosit (CD3+), T helper (CD4+), T sitotoksik (CD8+), CD4+/CD8+

oranı, aktive T lenfosit (CD25+), antijen sunan hücre (RT1B+), B lenfosit (CD45RA+), naturel killer (NK)-doğal öldürücü hücreler (CD161a+) ve nötrofil (CD11b+) belirteçleri çalışıldı. Sıçanlardan alınan 100 µl periferik kan örnekleri, florokrom ile işaretlenmiş özgül monoklonal antikorlar (20 µl) (BD Biosciences, San Diego, CA) ile inkübe edildi. Ardından oda ısısında 20 dk karanlıkta inkübe edildi. İn-kübasyon sonunda 1000 µl eritrositleri parçalayıcı solüsyon eklendi. 300 xg' de 5 dk santrifüj işlemi sonrası supernatant atıldı ve hücre peleti hücre yıkama solüsyonu (BD, Mountain View, CA) ile 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra hücre peleti 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek analize hazırlandı. Hazırlanan örnekler, akım sitometri cihazında (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) okundu. Her bir analizde 20 000 hücre değerlendirildi. Cellquest programında ön saçılım (forward scatter-FSC) ve yan saçılım (side scatter-SSC) sinyallerinin logaritmik amplifikasyonu ile hücre boyut ve granüleritesine göre oluşturulan noktasal grafikte (dot-plot) lenfositler seçildi. İzotipik kontrollere göre eşik değerler belirlendi. Lenfosit alt gruplarının hücre yüzey ekspresyonları ikişer renkli floresans noktasal grafik görüntüsü üzerinde değerlendirildi. İkinci tüpte toplam T lenfositler, T helper ve T supresor/sitotoksik lenfositler, üçüncü tüpte aktive T lenfositler ve dördüncü tüpte B lenfositler, naturel killer lenfositler ve aktif nötrofiller yüzde olarak belirlendi.

İnterferon-γ (IFN-γ) Analizi

Serum örneklerinde IFN-γ düzeyleri, ELISA temelli (eBioscience, San Diego, CA, USA) kit ile değerlendirildi. Örneklerdeki IFN-γ düzeyleri oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Kitin ölçüm aralığı 31,3-2000 pg/mL arasındadır. Duyarlılığı ise 9,9 pg/mL'dir.

Demir-Demir Bağlama ve Ferritin Analizleri

Serum örneklerinde demir-demir bağlama kapasitesi ve ferritin analizleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında, Abbott ticari kitleri ile Abbott Artitec C16000 (Abbott Laboratories, Lake Forest, IL) otoanalizörde yapıldı. Transferrin saturasyon değerleri, demir ve demir bağlama değerlerinin (µg/dL) birbirine oranlanması

ile hesaplandı ve % transferrin saturasyonu olarak ifade edildi. Ferritin düzeyleri de ng/mL olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

Karşılaştırmalı analizlerde nonparametrik istatistiksel analizler kullanıldı. Çoklu bağımlı gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde Friedman testi, çoklu bağımsız gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İki bağımlı grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde Wilcoxon, iki bağımsız grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunuldu. İstatistiksel analizler SPSS programının 15.0 versiyonu ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Toplam Lenfosit, Natural Killer (CD161a+) ve Nötrofil (CD11b+) Sonuçları

Toplam lenfosit, NK hücre ve nötrofil yüzdeleri açısından hem grup içi hem de kontrol, DS ve DD grupları arasında karşılaştırılma yapıldığında 0., 3., 6. ve 24. saatlerde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo I).

T Helper Lenfosit (CD4+) Sonuçları

DS grubunda hem kontrol grubu hem de DD grubuna göre 3., 6. ve 24. saatlerde T helper lenfosit yüzdesinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0,05$). Bununla birlikte, DD grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo I).

T Supresor / Sitotoksik Lenfosit (CD8+) Sonuçları

T supresor/sitotoksik lenfosit yüzdesi, DS grubunda 3. saatten itibaren anlamlı şekilde yükselmeye başlamıştır. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6. ve 24. saatlerde anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). DD grubu ile kontrol grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). DS grubunda DD grubuna göre T supresor/sitotoksik lenfosit yüzdeleri daha yüksek bulunsun da istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Grupların sonuçları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. T lenfosit alt gruplarının akım sitometrik analiz bulguları

Lenfosit alt grupları	Süre (Saat)	Kontrol (Serum Fizyolojik:SF) (n = 6)	Demir sükröz (DS) (n = 6)	Demir Dekstran (DD) (n= 6)	p
T Lenfositler (% CD3+ hücreler)	0.	52,5 ± 7,0	58,3 ± 7,9	50,6 ± 8,5	AD a, b, c
	3.	55,7 ± 6,9	54,0 ± 10,3	55,7 ± 12,4	AD a, b, c
	6.	56,3 ± 6,6	59,9 ± 6,4	65,3 ± 8,8*	AD a, b, c
	24.	52,3 ± 3,6	58,0 ± 6,2	59,7 ± 9,6*	AD a, b, c
T Helper/Inducer Lenfositler (% CD4+ hücreler)	0.	29,5 ± 7,2	30,5 ± 6,2	27,7 ± 8,0	AD a, b, c
	3.	31,8 ± 8,0	20,8 ± 7,1*	32,5 ± 6,8*	< 0,05 a, c
	6.	33,0 ± 8,7	23,1 ± 4,5*	40,6 ± 9,3*	< 0,05 a, c
	24.	30,3 ± 5,7	20,7 ± 3,9*	31,7 ± 6,7	< 0,05 a, c
T Baskılayıcı/Sitotoksik Lenfositler (% CD8+ hücreler)	0.	23,6 ± 9,5	26,6 ± 12,9	22,8 ± 12,7	AD a, b, c
	3.	24,3 ± 8,1	31,5 ± 9,9*	23,3 ± 13,3	AD a, b, c
	6.	23,4 ± 8,0	36,8 ± 8,6*	24,5 ± 15,4	< 0,05 a
	24.	22,6 ± 6,1	37,3 ± 6,8*	27,9 ± 12,1	< 0,05 a
CD4+/CD8+ oranı	0.	1,48 ± 0,8	1,64 ± 1,2	2,01 ± 2,2	AD a, b, c
	3.	1,48 ± 0,7	0,69 ± 0,3*	1,72 ± 0,8	< 0,05 a, c
	6.	1,62 ± 0,8	0,67 ± 0,2*	2,31 ± 1,5	< 0,05 a, c
	24.	1,47 ± 0,6	0,57 ± 0,1*	1,41 ± 0,9	< 0,05 a, c
Aktive T Lenfositler (% CD25+ hücreler)	0.	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,4	3,2 ± 0,6	AD a, b, c
	3.	3,5 ± 0,5	2,6 ± 0,7	3,5 ± 0,4	< 0,05 a, c
	6.	3,1 ± 0,9	1,8 ± 0,8*	2,8 ± 0,4*	< 0,05 a, c
	24.	2,3 ± 0,4*	1,3 ± 0,3*	2,6 ± 0,7*	< 0,05 a, c
Antijen Sunan Hücreler (% RT1B+ hücreler)	0.	3,6 ± 1,0	3,3 ± 1,6	3,6 ± 2,6	AD a, b, c
	3.	2,8 ± 1,6	2,1 ± 0,7*	3,2 ± 3,2	AD a, b, c
	6.	3,5 ± 2,6	1,4 ± 0,5*	1,9 ± 1,2*	< 0,05 a
	24.	2,5 ± 1,4*	0,9 ± 0,4*	1,7 ± 0,5*	< 0,05 a, c
B Lenfositler (% CD45RA+ hücreler)	0.	19,1 ± 4,2	15,9 ± 2,4	15,0 ± 3,1	AD a, b, c
	3.	18,2 ± 4,2	14,5 ± 3,8	13,3 ± 5,1	AD a, b, c
	6.	15,8 ± 4,3	8,8 ± 4,9	13,8 ± 1,8	< 0,05 a, c
	24.	19,5 ± 4,7	16,1 ± 5,4	14,8 ± 5,4	AD a, b, c
Naturel Killer Lenfositler (% CD161a+ hücreler)	0.	17,3 ± 3,1	21,9 ± 10,1	17,5 ± 2,5	AD a, b, c
	3.	19,4 ± 5,1	20,4 ± 8,7	18,3 ± 7,2	AD a, b, c
	6.	20,5 ± 1,8	22,6 ± 9,4	19,4 ± 10,5	AD a, b, c
	24.	15,7 ± 5,4	22,2 ± 6,0	20,4 ± 8,9	AD a, b, c
Nötrofiller (% CD11b+ hücreler)	0.	15,7 ± 4,7	16,4 ± 7,4	13,6 ± 4,2	AD a, b, c
	3.	15,7 ± 3,0	12,9 ± 5,7	12,1 ± 3,0	AD a, b, c
	6.	10,0 ± 3,5	11,6 ± 3,3	12,7 ± 3,1	AD a, b, c
	24.	12,2 ± 1,6	13,4 ± 4,9	12,8 ± 4,8	AD a, b, c

AD; anlamlı değil a; Kontrol vs DS b; Kontrol vs DD c; DS vs DD.

*p<0,05 vs 0. saat (grup içi)

T Helper / T Supressor (CD4+/CD8+) Oranı Sonuçları

DS grubunda hem kontrol grubu hem de DD grubuna göre T helper/T supressor oranında 3., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0,05$). DD grubu ile kontrol grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo I).

Aktive T Lenfosit (CD25+) Sonuçları

Kontrol ve DD grubu ile karşılaştırıldığında, DS grubunda aktive T lenfosit yüzdesinde 3., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). CD25+ lenfositler, DS ve DD gruplarının her ikisinde de kendi grupları içlerinde anlamlı olarak azalmıştır ancak DS grubundaki azalma daha fazla bulunmuştur. Grupların sonuçları Tablo I'de verilmiştir.

Antijen Sunan Hücre (RT1B+) Sonuçları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda, antijen sunan (RT1B+) hücre yüzdesinde 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). DS grubu ile DD grubu karşılaştırıldığında DS grubunda RT1B+ hücre yüzdesi 24. saatte anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p<0,05$). Antijen sunan hücre yüzdesi DS ve DD gruplarında azalmış olmasına karşın DS grubundaki azalma DD grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Ayrıca antijen sunan hücre yüzdesi DS grubunda 3. saatten itibaren, DD

grubunda ise 6. saatten itibaren anlamlı olarak düşmeye başlamıştır. Antijen sunan hücrelerde DD grubunda azalma olmasına karşın, kontrol grubu ile DD grubu arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo I).

B Lenfosit Sonuçları

Grupların karşılaştırılmasında B lenfositlerin yüzdesi açısından sadece 6. saatte farklılık saptanmıştır. Kontrol ve DD grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda B lenfosit yüzdesinde 6. saatte anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo I).

IFN- γ Düzeyleri

Kontrol ve DD grubu ile karşılaştırıldığında, DS grubunda 3. saatte IFN- γ da anlamlı bir baskılanma olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo II).

Demir, Demir Bağlama Kapasitesi ve Ferritin Düzeyleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem DS hem de DD grubunda daha yüksek demir ve daha yüksek transferrin saturasyonu saptanmıştır ($p<0,05$). DS grubunda DD grubuna göre demir düzeyi ve transferrin saturasyonu daha yüksek; demir bağlama kapasitesi daha düşük saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo II).

Tablo II. IFN- γ ve demir ile ilgili bulgular

	Süre (Saat)	Kontrol (Serum Fizyolojik: SF) (n = 6)	Demir Sükröz (DS) (n = 6)	Demir Dekstran (DD) (n = 6)	p
IFN- γ (pg/mL)	0.	105,3 \pm 11,0	92,2 \pm 10,3	216,1 \pm 19,5	AD a, b, c
	3.	134,0 \pm 89,0	41,6 \pm 20,8	134,0 \pm 6,7	< 0,05 a, c
	6.	192,5 \pm 100,0	169,8 \pm 105,0	177,4 \pm 50,0	AD a, b, c
	24.	159,1 \pm 47,0	190,1 \pm 128,0	228,7 \pm 116,0	AD a, b, c
Demir (μ g/dL)		118,7 \pm 7,1	155,0 \pm 19,9	130,0 \pm 10,8	< 0,05 a, b, c
Demir Bağlama (μ g/dL)		492,7 \pm 78,0	319,2 \pm 51,7	372 \pm 21,2	< 0,05 a, b, c
Transferrin saturasyonu (%)		24,5 \pm 4,1	49,3 \pm 7,6	34,9 \pm 3,3	< 0,05 a, b, c
Ferritin (ng/mL)		2,4 \pm 0,6	2,8 \pm 0,5	2,6 \pm 0,2	AD a, b, c

AD; anlamlı değil a; Kontrol vs DS b; Kontrol vs DD c; DS vs DD.

TARTIŞMA

Sağlıklı sıçanlarda yapılan bu çalışmada, demir sürozun CD4+T lenfositleri, demir dekstrana göre daha fazla oranda azalttığı, CD8+ T lenfositleri arttırdığı, CD4+/CD8+ oranını düşürdüğü, aktive T lenfositleri azalttığı, antijen sunan hücreleri azalttığı, IFN- γ düzeyini düşürdüğü ve aynı zamanda B lenfositleri de azalttığı gösterilmiştir.

Demir yüklemesi ile CD4+ T lenfositlerin sayısının azaldığı fazla transfüzyon yapılan talasemili hastalarda, genetik olarak demir depolanması ile seyreden hemokromatozisli hastalarda ve demir yüklemesi yapılan deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir (9).

Çalışmamızda demir süroz grubunda CD4+ T lenfositlerin sayısında 3. saatten itibaren anlamlı bir azalma saptanmıştır ve bu azalma 24. saat sonunda da devam etmiştir. Demir dekstran ve kontrol grubunda CD4+ T lenfositlerde düşme saptanmamıştır. Gupta ve ark. sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri ile oluşturdukları mononükleer hücre kültüründe, üç farklı demir preparatını (demir glukonat, demir süroz ve demir dekstran) uygulayarak (100 μ g/mL) gerçekleştirdikleri çalışmada, her üç demir preparatının da kontrol grubuna göre CD4+ T lenfositleri anlamlı şekilde düşürdüğünü göstermişlerdir. *In vitro* koşullarda yapılan bu çalışmada, demir sürozun ve demir glukonatin demir dekstran'a göre CD4+ T lenfositleri daha fazla baskıladığı saptanmıştır (7). Çalışmamızda demir dekstran ile kontrol grubu arasında farklılık saptanmamıştır. *In vivo* koşullarda yapılan bu çalışmamızın bulguları yukarıda sözü edilen *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen mevcut literatürün çalışma bulguları ile karşılaştırılmamaktadır.

Hemodiyaliz hastalarında yapılan, demir sürozun tek doz 30 ve 100 mg olarak hemodiyaliz seansının sonunda kullanıldığı bir başka çalışmada ise demir sürozun CD11b+, CD14+, CD36+ ve CD45+ dağılımı üzerine bir etkisi gösterilememiştir (10). Guz ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, CD4+ ve CD8+ T lenfositler çalışılmamıştır ve hemodiyaliz işleminin etkisi değerlendirilmemiştir. Cardier ve ark. tarafından sıçanlarda gerçekleştirilen diğer çalışmada ise demir dekstran üç hafta süre ile günlük 1.5 mg/kg dozda intramusküler uygulanmış ve 20. günde lenfosit sayısında azalma olduğu gösterilmiştir (11). Sousa ve

ark. tarafından yine sıçanlarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise demir sitrat yüklemesinin üç haftalık süre sonunda CD4+ / CD8+ oranını azalttığı gösterilmiştir. CD4+ / CD8+ oranındaki bu azalmanın lenfositlerdeki en fazla 12. saatte olduğu, 48. saatte ise eski düzeyine geldiği belirlenmiştir (12). Çalışmamızda ise demir preparatları tek doz uygulanmış ve akut etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmamızda, demir sürozun CD4+ / CD8+ oranını 3. saatten itibaren düşürdüğü ve bu düşüşün 6. ve 24. saatlerde giderek arttığı saptanmıştır. Çalışmamızda demir uygulamalarının 24 saat içindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda, demir süroz demir dekstran ile karşılaştırıldığında CD8+ T lenfositleri arttırdığı saptanmıştır. Literatürde, transfüzyonel demir yüklemesi bulunan talasemili hastalarda CD8+ T lenfositlerin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. CD8+ T lenfositlerin sayısındaki artış hemokromatozisli hastalarda da gösterilmiş olup mortalite ile ilişkisi kurulmuştur (9). Literatürde demir preparatlarının CD8+ T lenfositlerine etkisini karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma vardır; çalışmamız bu yönü ile literatüre katkı sağlayacaktır.

Hüresel ve humoral immüitenin dengeli çalışabilmesi için antijen sunan hücrelerle T lenfositlerin etkileşimi zorunludur. Antijen sunan hücreler ile T lenfosit etkileşiminden sonra T lenfositleri aktive olmaktadır. Bu etkileşimin olması için antijen sunan hücreler yüzeyinde yer alan MHC II gerekli olan moleküllerden bir tanesidir. Çalışmamızda demir sürozun antijen sunan hücreleri kontrol grubuna göre 6. ve 24. saatte, demir dekstran grubuna göre ise 24. saatte anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Antijen sunan hücreler, hem demir süroz hem de demir dekstran grubunda azalmış olmasına karşın demir süroz grubunda daha fazla azalmıştır. Demir dekstran ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda SDBY'li bulunan hastaların hücre kültürü çalışmalarında antijen sunan hücrelerin MHC II salınımının azaldığı gösterilmiştir. Ancak buna demir uygulanmasının etkisinin olup olmadığı çalışılmamıştır (12-14). Hemokromatozisli hastaların hücre kültürü çalışmalarında makrofajlardan MHC II salınımının azaltıldığı gösterilmiştir. Ancak bu hastalarda böbrek yetmezliği yoktur (15-17). Çalış-

mamız böbrek yetmezliği olmayan sağlıklı sıçanlarda yürütülmüş olup demir sükrözün antijen sunan hücreleri azalttığını gösteren bir çalışmadır.

Antijen sunan hücreler ile etkileşen T lenfositlerin aktive olup çoğalmaları için interlökin 2 ile etkileşmesi gereklidir. Bunu Th1 veya Th2 lenfositlerin farklılaşması izler. Th1 lenfositler IFN- γ sentezleyerek CD8+ T lenfositleri ve makrofajları aktif hale getirerek bağışıklık sisteminin hücre kolunu baskın hale getirir. Th2 lenfositler esas olarak IL-4 sentezleyerek B lenfositleri aktif hale getirirler (18). Çalışmamızda demir sükrözün aktive lenfositleri (CD25+) 3. saatten itibaren baskıladığı ve bunun 24. saatte de devam ettiği saptanmıştır. Literatürde aktive T lenfositlere demir uygulamasının etkisini inceleyen kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Aktive T lenfositler çoğunlukla organ nakli immünolojisinde çalışılmış olup dokuda artması doku reddi ile yakından ilişkilidir.

Yedi hafta süreyle ağız yoluyla yüksek miktarda demir içeren diyet (3000 veya 5000 mg/kg/gün) verilen farelerde INF- γ düzeyinde düşme saptanmıştır. Aynı farelere 7 mg/kg/gün demir içeren diyet verilmeye başlandıktan sonra da INF- γ düzeyinde artma olduğu gösterilmiştir (19). Sağlıklı insanların T helper hücre kültüründe 2, 10 ve 50 μ M demir klorürün doz bağımlı olarak INF- γ 'yı baskıladığı gösterilmiştir (16). Başka bir çalışmada ise sağlıklı insanlardan alınan T helper hücre kültüründe 25 μ M serbest demirin INF- γ ve MHC II salınımını azalttığı ve Th-1 yanıtını azalttığı gösterilmiştir (15). Demir yükü olan hemokromatozisli hastalarda da INF- γ düzeylerinin azaldığı ve INF- γ aracılı yolakların baskılandığı bildirilmektedir (17). Çalışmamızda da benzer şekilde demir sükrözün INF- γ 'yı baskıladığı gösterilmiştir. INF- γ düzeyinin CD4+ T lenfositlerle beraber düşmüş olması çalışmamızda demir sükrözün daha çok Th-1'leri etkilediğini yansıtmaktadır.

Çalışmamızda demir sükrözün B lenfositlerin sayısını 6. saatte azalttığı belirlenmiştir. Fernandez ve ark. B lenfosit sayısını hemodiyaliz hastalarında üremik olup diyalize girmeyenlere ve sağlıklı kontrollere göre daha düşük bulmuşlardır. Bu çalışmada üremik hastaların demir preparatı alıp almadığı ve hastaların demir yükü açısından karşılaştırılması yapılmamış ve hemodiyalizin etkisi de değerlendirilmemiştir (20). Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Pai ve ark. hemodiyaliz hastalarında yapmış oldukları çalışmada demir glukonat ve demir sükrözün demir dekstrana göre daha fazla serbest demir açığa çıkardığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada demir glukonat ve demir sükröz alanlarda transferrin saturasyonu ile serbest demir arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir. Ancak demir dekstran alanlarda aynı korelasyon gösterilememiştir (21). Çalışmamızda serum demir ve transferin saturasyonu önceki çalışmalarla benzer şekilde demir sükröz grubunda daha yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda demir sükröz ile demir dekstran'ın lenfosit dağılımlarına farklı etkilerinin molekül yapılarının çeşitliliğinden kaynaklandığını düşünüyoruz. İntravenöz demir preparatları demir-oksihidroksit jel içeren bir çekirdek ve bu çekirdeği kaplayan ve molekülün stabilleşmesine yarayan karbohidrat bir kılıftan oluşmaktadır. Bu kılıf biyoaktif demirin yavaş salınarak hastalar tarafından kolay tolere edilebilmesini sağlamaktadır. Demir preparatları arasındaki moleküler çeşitlilik çekirdek yapısı ve kılıf kimyasının farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu farklılık serbest demir oluşturma hızını, molekülün yarı ömrünü, infüzyon hızını ve maksimum tolere edilebilen dozu belirler. Küçük yapıdaki demir molekülleri daha hızlı demir açığa çıkarmakta ve plazmadan daha çabuk uzaklaşmaktadır (8). Demir dekstran, demir sükröze göre daha büyük çekirdeğe ve kılıfa sahiptir. Demir dekstranın demir sükröze göre serbest demir oluşturma hızı daha az, transferini doyurma zamanı ve plazma yarı ömrü ise daha uzundur. Bu veriler küçük moleküler ağırlıklı (demir sükröz gibi) demir preparatlarının daha fazla toksik etkilerinin olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile özellikle demir sükrözün CD4+ T lenfositleri, CD4+ / CD8+ oranını, aktive T lenfositleri, antijen sunan hücreleri, B lenfositleri ve INF- γ düzeyini baskıladığı saptanmıştır. Demir dekstranla sadece aktive T lenfositler ve antijen sunan hücreler olumsuz etkilenmiş olup bu etki demir sükröze göre daha azdır; bununla birlikte sayılan etkiler kısa süreli etkiler olup sonuçların böbrek yetmezlikli hastalara uyarlanabilmesi için kronik böbrek yetmezlikli hastalarda yapılacak olan ve demir preparatlarının daha düşük dozlarda ve uzun dönem etkilerini inceleyen yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Collins AJ, Li S, St Peter W, et al. Death, hospitalization, and economic associations among incident hemodialysis patients with hematocrit values of 36 to 39%. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2465-2473.
2. Patruta SI, Edlinger R, Sunder-Plassmann G, Hörl WH. Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:655-663.
3. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* 2002;32:70-78.
4. Kontoghiorghes GJ, Weinberg ED. Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. *Blood Rev* 1995;9:33-45.
5. Mencacci A, Cenci E, Boelaert JR, et al. Iron overload alters innate and T helper cell responses to *Candida albicans* in mice. *J Infect Dis* 1997;175:1467-1476.
6. Weiss G, Thuma PE, Mabeza G, Werner ER, Herold M, Gordeuk VR. Modulatory potential of iron chelation therapy on nitric oxide formation in cerebral malaria. *J Infect Dis* 1997;175:226-230.
7. Gupta A, Zhuo J, Zha J, et al. Effect of different intravenous iron preparations on lymphocyte intracellular reactive oxygen species generation and subpopulation survival. *BMC Nephrol* 2010;11:1-5.
8. Danielson BG. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:93-98.
9. Walker EM Jr, Walker SM. Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30: 354-365.
10. Guz G, Glorieux GL, De Smet R, Waterloos MA, Vanholder RC, Dhondt AW. Impact of iron sucrose therapy on leucocyte surface molecules and reactive oxygen species in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:2834-2840.
11. Cardier JE, Romano E, Soyano A. T lymphocytes subsets in experimental iron overload. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997;19:75-87.
12. de Sousa M, Reimão R, Porto G, Grady RW, Hilgartner MW, Giardina P. Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1991;171-177.
13. Stachowski J, Pollok M, Burrichter H, Baldamus CA. Immunodeficiency in ESRD-patients is linked to altered IL-2 receptor density on T cell subsets. *J Clin Lab Immunol* 1991;34:171-177.
14. Stachowski J, Pollok M, Burrichter H, Spithaler C, Baldamus CA. Signalling via the TCR/CD3 antigen receptor complex in uremia is limited by the receptors number. *Nephron* 1993;64:369-375.
15. Stachowski J, Pollok M, Barth C, Maciejewski J, Baldamus CA. Non-responsiveness to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: association with impaired TCR/CD3 antigen receptor expression regulating co-stimulatory processes in antigen presentation and recognition. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:144-152.
16. Weiss G, Fuchs D, Hausen A, et al. Iron modulates interferon-gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol* 1992;20:605-610.
17. Oexle H, Kaser A, Möst J, et al. Pathways for the regulation of interferon-gamma-inducible genes by iron in human monocytic cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:287-294.
18. Recalcati S, Pometta R, Levi S, Conte D, Cairo G. Response of monocyte iron regulatory protein activity to inflammation: abnormal behavior in genetic hemochromatosis. *Blood* 1998;91:2565-2572.
19. Omara FO, Blakley BR. The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br J Nutr* 1994;72:899-909.
20. Fernández-Fresnedo G, Ramos MA, González-Pardo MC, de Francisco AL, López-Hoyos M, Arias M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:502-510.
21. Pai AB, Boyd AV, McQuade CR, Harford A, Norenberg JP, Zager PG. Comparison of oxidative stress markers after intravenous administration of iron dextran, sodium ferric gluconate, and iron sucrose in patients undergoing hemodialysis. *Pharmacotherapy* 2007;27:343-350.