

DEMİR YÜKLEMESİNİN PLAZMA BAKIR VE ÇİNKO DÜZEYLERİNE ETKİSİ*

Hakkı Oktay SEYMEN, Murat MENGİ, Derviş ÖZÇELİK,
Tevfik GÜLYAŞAR, 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. In the structure of some antioxidant enzymes such as SOD, the copper and the zinc are involved. Our aim was to study the effect of iron overloading on the plasma copper and zinc levels.

Results.- Adult male Wistar albino rats weighing 200-205g were used. The animals were divided into 2 weight-matched groups. Group 1: Control group (n=6) and Group 2: Iron overloading group (n=7). The rats of 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 killed under ketamine anesthesia (50 mg/kg). Heparinized blood samples were obtained from aorta abdominalis. The plasma iron, copper and zinc levels 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 plasma free copper levels of iron overloading group were higher ($p<0.01$) than those of control rats. There was no significant difference between the plasma zinc levels of two groups ($P>0.05$).

Conclusion.- We concluded that the trace elements such as copper and zinc have very important effects on the oxidant/antioxidant status of the organism.

These are:

- 1- High iron levels of the plasma under iron overloading condition indicate the oxidant status in the organism.
- 2- The plasma Cu^+ levels increase iron overloading condition. This contributes to the metabolic activation of the antioxidant enzymes such as SOD.
- 3- The plasma Zn^+ concentrations of two groups are almost the same levels. This impact may be due to overutilization of zinc ions in iron overloading group.

Seymen HO, Mengi M, Özçelik D, Gülyaşar T, Seymen P, Yiğit G.

Effect of iron overloading on the plasma copper and the zinc levels.

Cerrahpaşa J Med 1999; 30 (2): 155-158.

Bazı anemilerin tedavisi, doğumsal hemokromatozis ve kan nakilleri gibi durumlarda plazma demir konsantrasyonu yükselmektedir. Demir yüklemesi kısa süreli bir uygulama da olsa, aşırı konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunun arttığı kanıtlanmıştır.^{1,2} Bu etki in vivo sıçan deneyleri, in vitro hepatik mikrozomlar ve insan lipozomlarında malondialdehit (MDA) artışıyla gösterilmiştir. Ayrıca demir yüklenen hayvanlarda solunumsal penton atımı ile dokularda konjuge dienlerin artışı belirlenmiştir.³

Demir, Fenton Reaksiyonu yoluyla en güçlü serbest radikal olan hidroksil (OH^{\cdot}) radikallerinin oluşmasını sağlarken, stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Benzer etki bakırın (Cu^{+2}) girdiği indirgen transizyon metallerinin otooksidasyonu

reaksiyonlarında da görülmektedir. $Cu^+ + O_2 \rightarrow Cu^{++} + O_2^-$ Membran lipidlerinde peroksidasyon işlevi hidrosil, alkoksi ve peroksi radikalleri gibi reaktif maddelerin bir metilen grubundan hidrojen atomunu çıkarması ile gerçekleşir.⁴ Çoklu doymamış yağ asitleri membran lipidlerinde bulunur ve peroksidasyona duyarlıdır.

Bakırın yukarıdaki reaksiyondan başka, insan vücudunda önemli fonksiyonları vardır. Hücreleri lipid peroksidasyonundan koruyan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) enziminin yapısında bulunurlar. Mitokondrial sitokrom oksidazların önemli elementidir. Bakırın plazmada taşınmasında rol oynayan serüloplazminin yapısında da bakır bulunmaktadır. Hemoglobinin sentezinin değişik evrelerinde bakır kullanılmaktadır. Serbest bakır organizmada hücre membranları üzerine prooksidan bir ajan olarak rol oynamaktadır. Ancak toplumda bakır eksikliği çok nadir görülür ve tedavi amacıyla bakır supplementasyonu da yapılmamaktadır.

Bir başka eser element olan çinko (Zn^{+2}), insan organizmasındaki birçok enzimin işleyişinde görev almaktadır. SOD enziminin yapısında bakır oranında çinko da bulunmaktadır. Plazmada serbest halde bulunan çinko, hücrelerde membran stabilizatörü olarak fonksiyon görmektedir.⁵ Çeşitli biyolojik moleküllere bağlanarak demir ve bakırın bağlanmasını ve dolayısıyla bunların yapacakları oksidatif hasarı önlemektedir. Bu nedenle çinko antiperoksidatif etkiye sahip bir element olarak tanımlanır. Özetle, Fe, Cu ve Zn oksidan/antioksidan sistemlerde reaksiyonların etkileşiminde değişime uğrayan önemli elementler olmalıdır.

Daha önce demir uygulaması ile ilgili çalışmalarımızda, demirin oksidan stres faktörü olduğu, plazmada MDA'nın çok anlamlı yükselmesiyle gösterilmiştir.¹ Aynı deney serisinde, eritrosit içi enzim tayinleri de yapılmış, Cu, Zn-SOD, Glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin eritrositlerde arttığı belirlenmiştir. Sunduğumuz çalışma oksidatif olayların arttığı demir yüklemesi durumunda, plazma bakır ve çinko eser elementlerinin değişimlerinin incelenmesi amacıyla planlanmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmada Wistar -Albino tipi 13 erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan hayvanlar standart laboratuvar sıçan yemiyle ve çeşme suyuyla beslendi. Sıçanlar 1. Kontrol grubu ve 2. Demir yüklemesi yapılan grup ($n=7$) olarak ikiye ayrıldı. 2. Gruptaki sıçanlara 10 gün süreyle intraperitoneal Ferro III polimaltaz (250 mg/kg/ gün) enjekte edildi. Bu sürenin sonunda sıçanlara ketamin (50 mg/kg) anestezisi uygulandı. Abdominal bölgeden yapılan diseksiyonla periton içindeki organlar incelendi. Abdominal aortadan tüm sistemik kan (yaklaşık 5 ml) alındı. Karaciğer, dalak ve pankreas morfolojik inceleme amacıyla çıkarılarak fikse edildi. Heparinize tüplere alınan kan örnekleri santrifüje edilerek (3000 rpm) plazma süpernatantı ayrıldı.

Ayrılan süpernatantlar ölçüm yapılana kadar $-20^{\circ}C$ de saklandı. Atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile plazma bakır ve çinko düzeyleri ile, oksidan stres göstergesi olarak demir düzeyleri ölçüldü.

Her bir elementin ölçümü için Titrosol 1000 ± 0.002 mg (Merck) standard stok solusyonundan demir ve bakır için 1 ve 2, çinko için 0.5 ve 1 μ l/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı. Kör olarak bidistile su kullanıldı. Alette her elemente ait özel

dalga boyunda ışık veren HCL (Hollow Cathod Lamp) lambaları ile yine her elemente uygun hava-asetilen gaz karışma, silit aralığı HCL ve BGC (Back Ground Correction) modları seçildi. Bu şartlarda k0r ve standart 0zetiler alete (Shimadzu AA-680) verilerek kalibrasyon eğrileri çizildi. Altın 0rneklerin 0l0m0 yapıldı.

Bulgularımızın istatistiksel değerendirmesi, SPSS istatistik programı ile Student-t testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

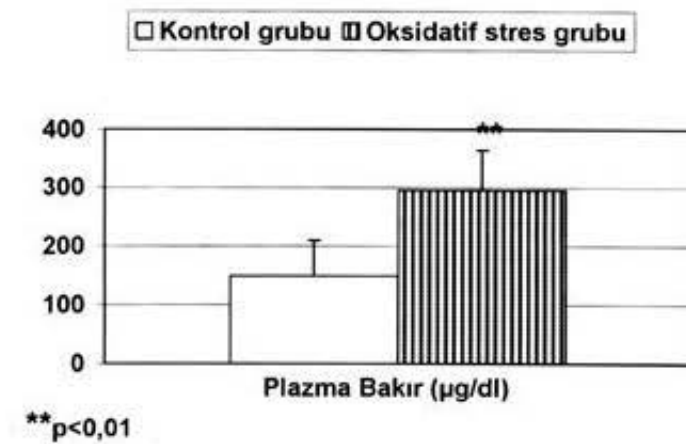
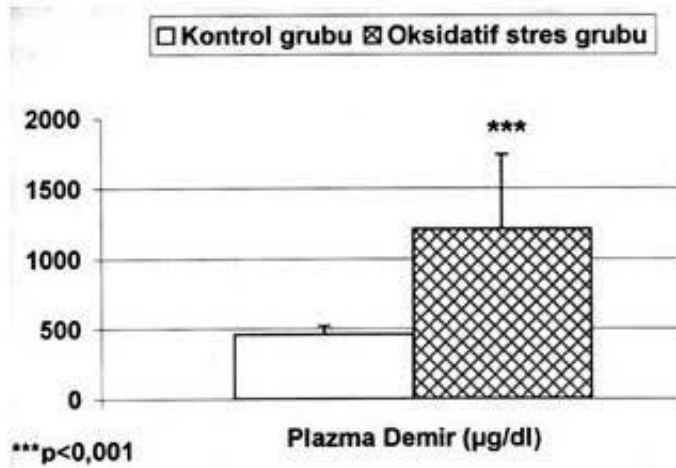
BULGULAR

Bulgularımız Tablo I'de topluca g0sterilmektedir. Deney gruplarındaki bulguların grafikleri ise Şekil 1, 2, 3'te g0r0lmektedir.

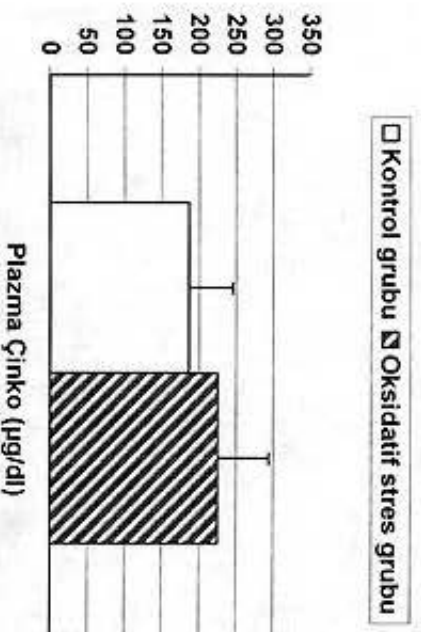
Tablo I. Kontrol ve Deney gruplarında 0l0len parametreler (Ortalama \pm standart sapma).

	Kontrol Grubu	Oksidan Stres Grubu
Plazma Demir ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	459.58 \pm 64.16	1207.71 \pm 529.26***
Plazma Bakır ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	148.5 \pm 74.53	294.78 \pm 113.53**
Plazma inco ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	185.75 \pm 59.81	224.57 \pm 69.14

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



Şekil 3. Kontrol ve deney gruplarında plazma inco d0zeleri



Bulgularımıza göre; plazma serbest demir düzeyi oksidan stres grubunda kontrol grubuna göre çok anlamlı olarak yüksek ($p<0,001$) bulundu. Bakır düzeyi, aynı şekilde deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) yüksek bulundu. Plazma serbest çinko düzeyi ise demir yüklü olan grupta yüksek bulunmasına karşın, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Demir plazmada yüksek konsantrasyonda bulunduğu anda, çeşitli dokularda birikim yapabilen bir elementtir. Bu birikim dokuların fizyolojik fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Bunun yanında, plazmadaki serbest demirin hücre membranları üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak oksidan stres etkisi de bulunmaktadır.⁶⁻⁸ Oksidan stres reaksiyonlarının gidildiği son ürün olan malondi aldehidin (MDA) plazmadaki konsantrasyonu ise belirtilmektedir. Komuya ilgili bir araştırmamızda MDA düzeyi ile plazma serbest demir konsantrasyonu arasında ilgili bulunmuştur.¹⁵ Bu bağlamda oksidan stres koşulu oluşturulmuş istenen deneysel modellerde, serum demir düzeyi oksidan stres kriteri olarak alınabilir. Araştırmamızda kontrol ve deney grupların plazma demir düzeylerindeki çok anlamlı farklılık ($p<0,001$) oksidan stres koşullarını sağlandığına göstermektedir.

Organizmada eser elementler plazmada serbest halde bulunurları gibi çok farklı enzimlerin yapısında, bağli olarak da yer alırlar.⁹ Gereklerinin durumunda serbest halden bağli, bağli halden serbest duruma geçerler. Plazmada demirin yüksek olduğu deney grubumuzda, plazma Cu+2 düzeyinde de artış saptanmıştır ($p<0,01$). Bu bulgu oksidan stres koşullarının oluyununa, antioksidan aktiviteinin artmasına ilgili olabilir.

Komuyu şu şekilde ayıklayabiliriz; hücrelerde oksijen radikallerinden korunmak amacıyla intraselüler savunma sistemleri gelişmektedir. Antioksidanlar adı verilen bu sistemler oksijen radikallerinin oluyununu bloke ya da oluyunuy radikalleri inaktive eden enzimlerden oluşur. Glutathione savunma sistemi içinde SOD, katalaz ve glutathion peroksidaz enzimleri üzerinde fazla çalışma bulunmaktadır.^{4,6,9} Süperoksit dijenaz (SOD) O₂'nin H₂O₂'ye indirgenmesini sağlama katalizör bir metalloproteinlerdir. Bu protein, Fe, Mn, Cu ve Zn içeren yapılar olarak farklılık gösterebilir. Çeşitli metal iyonlarında bu enzim malonondi, endoplazmik retikulum ve

sitoplazmada bulunmuştur.^{6,9,10} Fe yüklemesi yapılan deney grubumuzda plazmada serbest demir düzeyinin artmasına bağlı olarak oksidan ortam oluşmuştur. Bu ortam demirin serbest dağılımını gösterdiği plazma ile demir birikiminin olduğu doku ya da hücrelerdir. Oksidan stres oksidan/antioksidan dengenin korunması için hücrelerde SOD üretimi ve tüketimi çok fazla artar. Çünkü, serbest oksijen radikalleri membran fosfolipidleri proteinleri ve nükleik asitleri etkileyerek doku haraplanmasına neden olmaktadır.

Radikal toksikasyonunu engelleyen SOD enziminin, plazma demir artışıyla paralellik gösterebileceği ileri sürülmektedir. Demir yüklemesi yapılan bir çalışmamızda, eritrosit içi SOD artışı da bu görüşü kanıtlamıştır. Cu, Zn-SOD enziminin, oksidan olaylara karşı artışı, beraberinde enzim yıkımının artmasına neden olacaktır. Plazmada serbest Cu^{++} 'un yüksek bulunması, enzimin yıkım ürünü olarak açıklanabilir.

Antioksidan özellikli Zn^{+} düzeyleri incelendiğinde, deney grubunun plazma Zn^{+} su kontrole göre biraz yüksek bulunmuştur. Ancak bu farkın anlamlı olmaması, Zn^{+} nun membranlar üzerinde antiperoksidatif koruyucu etkisini düşündürmektedir. Yüksek demir içeren ortamlarda membranların Zn^{+} kullanımı hızlanır. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, protein hasarı, membran permeabilitesinin bozulması, Na^{+} ve Ca^{+} pompalarının bozulması fizyolojik fonksiyonlar açısından çok önemlidir. Zn^{+} özellikle protein sentezinin hızlanması ve membran onarımı - stabilitesini, koruyan enzimlerle yoğun bir aktiviteye katılmaktadır. Özetle Fe yüklenmesiyle oluşan oksidasyon olayları antioksidan sistemlerin tetiklenmesine neden olmaktadır. Sistem enzimlerinin aktivasyon ve yıkımı (Cu, Zn-SOD) yapısında bulunan Cu^{++} ve Zn^{+} gibi elementlerin plazmada artmasına neden olur. Zn^{+} , membran onarımına yeniden katılımı ya da elementin yeniden kullanımı söz konusudur. Bu nedenle plazmada Zn^{+} düzeyinin değişmediği görülmüştür.

ÖZET

Demir yüklemesinde kısa süreli bir uygulama da olsa plazmada, aşırı konsantrasyonlarda demir artması durumunda lipid peroksidasyonun arttığı bildirilmektedir. Araştırmamız oksidatif olayların arttığı demir yüklemesi durumunda, plazma bakır ve çinko eser elementlerin değişimlerinin incelenmesi amacıyla planlandı.

Çalışma Wistar - Albino tipi 13 erkek sıçanda yapıldı. Sıçanlar 1. Kontrol grubu (n=6) ve 2. Demir yüklemesi yapılan grup (n=7) olarak ikiye ayrıldı. 2. Grup sıçanlara 10 gün süreyle, intraperitoneal Ferro III polimaltoz (250 mg/kg/gün) enjekte edildi. Süre sonunda sıçanlardan ketamin (50 mg/kg) anestezisi altında abdominal aortadan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile plazma bakır ve çinko düzeyleri ile, oksidan stres göstergesi olarak demir düzeyleri ölçüldü.

Bulgularımıza göre plazma serbest demir düzeyi oksidan stres grubunda çok anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$). Bakır düzeyi, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik gösterdi ($p<0,01$). Plazma serbest çinko düzeyi demir yüklenen grupta yüksek bulunmasına karşın, istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Organizmadaki oksidan/antioksidan dengenin korunmasında bakır ve çinkonun önemi konusunda şu sonuca varıldı;

- 1- Plazmada demir düzeyinin yüksek olması oksidan statünün göstergesidir.
- 2- Cu^+ artışı oksidan stresle antioksidan enzimlerin (SOD) metabolik aktivasyonuna bağlandı.
- 3- Belirtilen koşullarda çinko tüketiminin aşırı artışı nedeniyle, plazmada Zn^+ düzeyinin değişmediği düşünülüyor.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Gutteridge J. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. *Biochem J* 1987; 243: 709-714.
3. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology*, 1989; 26: 277-285.
4. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet* 1994; 334: 721-724.
5. Tanakol R. Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 347-357.
6. 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.
7. 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.
8. Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, Makuc DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *N Eng J Med* 1994; 30: 1119-1124.
9. Barutçu UB, Akyolcu MC, Kiziler AR, Oke N, Toplan S, Karakoc Y, Onen S. Effects of coronary artery diseases on haemorheological parameters and trace elements. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6: 289-294.
10. Rosario Z, Hidalgo FJ, Tappel AL. Comparative antioxidant effectiveness of dietary β -carotene, vitamin E, Selenium and Coenzyme Q 10 in rat erythrocytes and plasma. *J Nutr* 1991; 121: 50-56.

-
- **Anahtar Kelimeler:** Oksidan stres, demir, bakır, çinko; **Key Words:** Oxidant stress, iron, copper, zinc; **Alındığı Tarih:** 28 Eylül 1998; **Doç. Dr. Hakkı Oktay Seymen, Bio. Murat Mengi, Prof. Dr. Günnur Yiğit: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı; Dr. Derviş Özçelik, Dr. Tevfik Gülyazar: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı; Dr. Pınar Seymen: T.C. Haydarpaşa Numune Hastanesi 2. Dahiliye Kliniği. Yazışma Adresi (Address): Dr. H.O. Seymen, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.**

