

Demir Eksikliği Anemisinde Eritrosit Redükte Glutatyon Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri

REDUCED GLUTATHIONE AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH IRON-DEFICIENCY ANEMIA

Dr.Keriman YILMAZ,^a Dr.Ahmet KAHRAMAN,^a Dr.Sevgi BODUR,^a Dr.Sibel KOÇAR,^a Dr.Tülay KÖKEN^a

^aBiyokimya AD, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, AFYON

Özet

Amaç: Bu çalışmada demir eksikliği anemisi olan hastaların eritrosit antioksidan enzim aktivitelerini ve plazmada oksidatif hasar son ürünlerinin düzeylerini belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Demir eksikliği olan 20 hastanın eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) aktivitelerine ve redükte glutatyon (GSH) düzeylerine bakıldı. Aynı zamanda plazmalarından da malondialdehid (MDA), protein karbonil içeriği ve total sülfidril (SH) grupları konsantrasyonu ölçüldü.

Bulgular: Eritrosit GSH konsantrasyonu kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0.01$) SOD ve KAT aktivitelerinin belirgin olarak yükseldiği gözlemlendi ($p<0.001$, $p<0.001$). Plazma MDA ve protein karbonil konsantrasyonları ise kontrol grubundan farklılık göstermezken total SH grupları düzeyi hasta grubunda anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.01$).

Sonuç: Eritrosit membran stabilitesini sağlayan önemli komponentlerden biri olan GSH'nın demir eksikliği anemisinde azalması membran instabilitesine yol açarak eritrosit yaşam süresinin kısılmasına yol açmış olabilir.

Anahtar Kelimeler: Demir eksikliği anemisi, süperoksit dismutaz, katalaz, redükte glutatyon

T Klin J Med Sci 2004, 24:305-308

Abstract

Objective: The present study was performed to evaluate erythrocyte antioxidant enzymes in patients with iron-deficiency anemia (IDA). Alterations in plasma end-products of oxidative damage were investigated as well.

Material and Methods: Erythrocyte superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and reduced glutathione (GSH) levels were evaluated in 20 patients with IDA and compared to those in a control group. In addition, we measured the concentrations of plasma malonyldialdehyde (MDA), protein carbonyl content and total sulphhydryl (SH) groups.

Results: Erythrocytes GSH levels in IDA patients were significantly lower than those in the controls ($p<0.01$). Erythrocyte SOD and CAT activities were also significantly higher in IDA patients (both $p<0.001$). There were no significant differences in MDA and protein carbonyl content levels between the two groups. However, total SH group levels were significantly lower in IDA patients ($p<0.01$).

Conclusion: Decreased erythrocyte GSH levels, an essential factor for membrane mechanical integrity in IDA, may cause membrane instability and contribute to decreased erythrocyte half-life.

Key-Words: Iron-deficiency anemia, superoxide dismutase, catalase, reduced glutathione

Demir eksikliği anemisinde eritrositlerin oksidantlara karşı hassasiyetinin arttığı ve yaşam sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir.¹ Bu çalışmada eritrosit içi ve plazma antioksidan savunma sistemlerinin demir eksikliğinde ortaya

çıkan bu bulgular üzerine etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Glutatyon sentezinde rol oynayan gama-glutamilsistein sentaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin konjenital defektlerinde hemolitik anemilerin gözlenmesi glutatyonun hücre membran bütünlüğü için vazgeçilmez olduğunu göstermektedir.^{2,3} Demir eksikliği anemisinde eritrosit içi antioksidan enzim aktivitelerinde de çelişkili olmakla birlikte değişiklikler ileri sürülmektedir.⁴⁻⁶

Bu çalışmada henüz demir tedavisi almamış ve demir eksikliği tanısı konmuş hastaların eritrositlerinde redükte glutatyon (GSH) düzeyleri,

Geliş Tarihi/Received: 11.04.2003 Kabul Tarihi/Accepted: 16.02.2004

Yayın 27-30 Mart 2003 tarihinde . 3. Ulusal Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Kongresinde Poster olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Tülay KÖKEN
Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD,
İnönü Bulvarı Uygulama ve Araştırma Hastanesi
03200 AFYON
tkoken@aku.edu.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. Eritrositlerin içinde bulunduğu plazmadan da etkileneceği düşünülerek plazma total sülfidril içeriğine (SH) ve oksidatif hasarın göstergesi olarak da malondialdehid (MDA) ile protein karbonil içeriği tayin edildi.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesinde demir eksikliği anemisi tanısı konmuş ve çalışma oluru alınmış 47 ± 19 yaşlarında 20 hasta (15 kadın + 5 erkek) alındı. Hastaların tanısını destekleyen laboratuvar bulguları Tablo 1'de verilmiştir. Sistemik hastalıkları olan ve antioksidan ilaç alanlar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubu check-up polikliniğine gelen, yaş ve cinsiyeti hasta grubuna uygun (yaş: 43 ± 15 ; 6 kadın+2 erkek) 8 sağlıklı gönüllüden oluşturuldu.

Hastaların kanları sabah aç karna K_3EDTA içeren tüplere alındı. Plazmaları ayrıldıktan sonra eritrositler serum fizyolojik ile üç kez yıkanarak eritrosit paketleri hazırlandı ve analize kadar $-20^{\circ}C$ de saklandı. Eritrositler buzlu su ile patlatıldıktan sonra GSH konsantrasyonu ve SOD, katalaz enzim aktiviteleri ölçüldü. Eritrosit SOD (E.C.1.15.1.1) aktiviteleri Winterbourn tarafından tarif edilen yöntem ile⁷ katalaz (E.C.1.11.1.6) aktiviteleri ile⁸ GSH⁹ düzeyleri Beutler metodu ile belirlendi. GSH düzeyi sonuçları nmol/g hemoglobin olarak, SOD ve katalaz aktiviteleri U/g hemoglobin olarak verildi.

Plazmada ise lipid peroksidasyonu son ürünlerinden biri olan MDA, tiobarbitürikasit metodu ile,¹⁰ total SH grupları Ellman reaktifi (5,5'-

Tablo 1. Hastaların laboratuvar anemi bulguları:

Testler	Ortalama±SD
Serum demir düzeyi (µg/dl):	19,4 ±7,2
Serum Total Demir Bağlama Kapasitesi(µg/dl):	571 ±167
Serum Ferritin düzeyi (ng/ml):	4,7±2,1
Hemoglobin (g/dl):	8,5 ±1,0
Ortalama eritrosit volümü (fl):	75 ±9

ditiobis-2-nirrobenzoik asit) kullanılarak,¹¹ protein oksidasyon ürünü olan karbonil içeriği ise dinitrofenilhidrazin ile reaksiyon prensibine dayalı spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü.¹² Plazma sonuçlarını tümü µmol/L olarak verilmiştir

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Wilcoxon rank testi kullanılarak belirlenmiştir.

Sonuçlar

Eritrosit içi önemli antioksidan potansiyel olan GSH konsantrasyonu demir eksikliği anemisi olan hasta grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşük bulundu ($47,09 \pm 5,93$ nmol/g hemoglobin, $81,44 \pm 1,73$ nmol/g hemoglobin; $p < 0,01$). Eritrosit için önemli olan iki antioksidan enzim SOD ve katalaz aktivitelerinin her ikisi de demir eksikliği anemisi olan hasta grubunda kontrolden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (SOD: $19,82 \pm 1,19$ U/g hemoglobin, $8,33 \pm 0,59$; $p < 0,001$, katalaz: 5660 ± 344 U/g hemoglobin, 3118 ± 103 U/g hemoglobin; $p < 0,001$).

Demir eksikliği anemisi olan hastaların plaz-

Tablo 2. Demir eksikliği anemisi olan hastaların plazma MDA, protein karbonil ve total SH grupları ile eritrosit GSH, SOD, KAT sonuçları ve kontrol grubu ile kıyaslamaları

	Kontrol Grubu	Hasta Grubu
Eritrosit GSH (nmol/g hemoglobin)	81,44±1,73	47,09±5,93*
Eritrosit SOD (U/ g hemoglobin)	8,33±0,59	19,82±1,19**
Eritrosit CAT (U/ g hemoglobin)	3118±103	5660±344**
Plazma Total SH (µmol/L)	641±14,5	492±30,6*
Plazma Karbonil içeriği (µmol/L)	69,87±1,4	85,3±5,75
Plazma MDA (µmol/L)	0,328±0,015	0,345±0,030

* $p < 0,01$ kontrol ile kıyaslandığında

** $p < 0,001$ kontrol ile kıyaslandığında

malarında lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA ile protein oksidasyonu göstergesi olan karbonil içeriklerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulunamamıştır. Plazmanın önemli bir antioksidanı olan total SH grupları ise demir eksikliği anemisi olan hasta grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($492 \pm 30,6 \mu\text{mol/L}$, $641 \pm 14,5 \mu\text{mol/L}$; $p < 0.01$).

Tartışma

Yapılan çalışmalar demir eksikliği anemisinin oksidatif stres ile seyrettiğini göstermiştir.¹³ Çalışmamızda demir eksikliği anemisinde bulduğumuz düşük eritrosit GSH konsantrasyonunun artan oksidatif strese bağlı olabileceğini düşündürmektedir. GSH, eritrositlerin en önemli indirgeyici ajanı olup hemoglobini oksidasyondan korur. Bununla beraber eritrosit membranını lipid peroksidasyonundan koruyucu etkiye sahiptir.¹⁴ GSH konsantrasyonunun azalma nedeni tam olarak bilinmemekle beraber hücrenin yaşam süresinin kısalmasının sebep olabileceği düşünülebilir. Eritrosit GSH konsantrasyonundaki düşüklüğün yanı sıra plazmanın en önemli serbest radikal yakalayıcıları olan SH grupları düzeyinde de düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün eritrositlerdeki azalan antioksidan aktiviteyi kompanse ederek oksidatif hasarı engellemeye çalıştığı için olabileceğini düşünmekteyiz.

Pek çok dokuda olduğu gibi eritrosit içinde (oksihemoglobin gibi) süperoksit anyonunun oluşumuna neden olan kaynaklar vardır. Süperoksit spontan olarak dismutasyona uğrayarak oksijen ve hidrojen peroksit dönüşür. Katalitik geçiş metallerinin varlığında süperoksit ve hidrojen peroksit reaksiyona girerek oldukça potent redoks ajan olan hidroksil radikalının ortaya çıkışına neden olur. Bu nedenle eritrosit içerisinde süperoksit ve hidrojen peroksitin birikmesini engelleyecek SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH Px) gibi enzimler mevcuttur. SOD süperoksit radikalini oksijene ve hidrojen peroksit dönüşümünü hızlandırırken, katalaz ve GSH Px hidrojen peroksidi suya ve moleküler oksijene dönüştürür. Demir eksikliği anemisinde eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin artışı ve azalışını gösteren çalışmalar yanında değişmediğini gösteren çalışmalara da rastlanmıştır.^{4-6,15} Bu çeliş-

kinin demir eksikliği anemisinde gözlenen hemoglobin düşüklüğü göz önüne alınmadan enzim aktivitelerinin gram hemoglobin başına bölünmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Nitekim çalışmamızda SOD ve CAT aktivitelerindeki yükselişin de buna bağlı olduğunu düşünmekteyiz. GSH düzeyinde de aynı şekilde relatif bir artışın olabileceğini düşünürsek sonuçlarda verdiğimiz GSH konsantrasyonun daha da altında olduğunu kabul edebiliriz.

Katalitik geçiş metallerinin varlığında oksidatif hasar arttıktan sonra bunların eksikliğinde antioksidan savunmanın azalması oldukça zıt bir bulgu olmakla birlikte demir eksikliğinin karaciğer MDA düzeyini azalttığını gösteren¹⁶ ve peroksidasyona karşı in vivo koruyucu etkilere sahip olduğunu savunan¹⁷ grupların yanı sıra oksidatif hasara yol açtığını gösteren gruplar da vardır.^{18,19}

Yapılan çalışmalar demir eksikliğinin iskelet kası, kalp, karaciğer ve kan hücrelerinde mitokondrial fonksiyon bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir.²⁰ Bu çalışmalarda mitokondride sitokrom konsantrasyonunun azaldığı ve solunum kontrolünün bozulduğu gösterilmiştir. Walter ve arkadaşları²¹ demir eksikliğinde karaciğer MDA düzeylerindeki artışa, mitokondride solunum zincirinde oksidasyon-fosforilasyon eşleşmesinin bozulmasına bağlı olarak artan süperoksit salınımının ve sitokrom konsantrasyonundaki azalmanın sebep olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda plazma total SH konsantrasyonunun azalma nedeninin dokulardan salınan reaktif oksijen ürünlerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, eritrosit membran stabilitesini sağlayan önemli komponentlerden biri olan GSH demir eksikliği anemisinde azalmıştır. Bu da membran instabilitesine yol açarak eritrosit yaşam süresinin kısalmasına yol açmış olabilir. Bu sonuçlar demir eksikliği anemisinde antioksidan preparatların yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bartal M, Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N. Iron deficiency anemia: recovery from in vitro oxidative stress. *Acta Haematol* 1993;90(2):94-8.

2. Beutler E, Moroosse R, Kramer L, Gelbart T, Forman L. Gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* 1990;75:271-3.
3. Beutler E, Gelbart T, Pegelow C. Erythrocyte glutathione synthetase deficiency leads not only to glutathipne but also to glutathione-S-transferase deficiency. *J Clin Invest* 1986;77:38-41.
4. Tekin D, Yavuzer S, Tekin M, Akar N, Cin Ş. Possibl effects of antioksidant status on increased platelet aggregation in childhood iron-deficiency anemia. *Pediatr Int* 2001;43:74-7.
5. Isler M, Delibas N, Guclu M, et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different modalities. *Croat Med J* 2002;43(1):16-9.
6. Jansson TL, Perkkio M, Willis WT, Refino CJ, Dallman PR. Red cell superoxide dismutase is increased in iron deficienci anemia. *Acta Hematol* 1985;74:318-21.
7. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Correll R.W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1957;49: 84-95.
8. Beutler E. Red cell metabolism. A manuel of biochemical methods. New York: Grune & Stration Inc; 1973. p. 76.
9. Beutler E, Robson MJ, Bittenwieser E. The glutathione instability of drug sensitive red cells. *J Lab Clin Med* 1957;49:84.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
11. Koster JF, Biemond P, Swaak AJ. Intracellular and extracellular sulfhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986;45: 44-46.
12. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186: 464-78.
13. Vives CJL, Miguel-Garcia A, Pujades MA, et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur J Haematol* 1995;55:327-31.
14. Fuji S, Dale GL, Beutler E. Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood* 1984;63(5):1096-101.
15. Kumerova A, Lece A, Skesters A, Silova A, Petuhovs V. Anemia and antioxidant defence of the red cells. *Mater Med Pol* 1998;30:12-5.
16. Rao J, Jagadeesan V. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in iron deficiency and effect of carcinogen feeding. *Free Radic Biol Med* 1996;21:103-8.
17. Patt A, Horesh I R, Berger EM, Harken A H, Repine JE. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg* 1990;25:224-7.
18. Uehara M, Chiba H, Mogi H, Suzuki K, Goto S. Induction of increased phosphatidylcholine hydroperoxide by an iron-deficient diet in rats. *J Nutr Biochem* 1997;8:385-91.
19. Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both Iron Deficiency and Daily Iron Supplements Increase Lipid Peroxidation in Rats. *J Nutr* 2000;130:621-8.
20. Dallman PR. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu Rev Nutr* 1986;6:13-40.
21. Walter PB, Knutsan MD, Paler-Martinez A, et al. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(4):2264-9.