

Effect of oxidative stress induced by iron overload in Rabbits on some biochemical parameters

تأثير الإجهاد التأكسدي المستحث من فرط الحديد في الأرانب على بعض المعايير الكيموحيوية

الكريطي, حيدر بخيت والبازي, وفاق جبوري و العواد, هيام عبد الرضا
جامعة كربلاء / كلية التربية

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى معرفة تأثير الإجهاد التأكسدي المستحث من فرط الحديد في ذكور الأرانب المحلية و الدور الوقائي لفيتامين (هـ) ضد ضرر الأكسدة .

أذ أجريت الدراسة في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية /جامعة كربلاء و تم استخدام 15 حيوان من ذكور الأرانب البالغة والتي قسمت عشوائيا على ثلاث مجاميع (خمسة حيوانات لكل مجموعة) حيث حقنت المجموعة الأولى 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي و عدت كمجموعة سيطرة T1, أما المجموعة الثانية T2 فقد حقنت عضليا بـ 15 ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد Iron dextran ثلاث مرات أسبوعيا, في حين حقنت المجموعة الثالثة T3 بـ 15 ملغم/كغم عضليا بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعيا مع التجريع الفموي لفيتامين (هـ) بجرعة 20 ملغم/كغم يوميا وعلى طول مدة التجربة البالغة تسعة أسابيع. جمعت عينات الدم في الأسبوع الثالث و السادس و التاسع لقياس المعايير التالية:- عدد كريات الدم الحمراء Red blood corpuscles (RBC), حجم مكدها الدم Packed cell volume(PCV), تركيز الهيموكلوبين Hemoglobin(Hb) و تركيز الحديد الحر Free iron وسعة ارتباط الحديد الكلي Total iron banding capacity (TIBC) والنسبة المئوية لإشباع البروتين الناقل للحديد (الترانسفيرين) Transferrin .

أظهرت نتائج المجموعة المعاملة بالحقن العضلي لدكستران الحديد حدوث انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ في أعداد كريات الدم الحمراء ومكداس الدم وتركيز الهيموكلوبين, فيما لوحظ ارتفاع معنوي $P < 0.05$ في تركيز الحديد الحر في الدم Free Iron وسعة ارتباط الحديد الكلية ونسبة إشباع الترانسفيرين بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. فيما أظهرت المجموعة المعاملة بفيتامين (هـ) و المعرضة لفرط الحديد عن طريق دكستران الحديد ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ في تركيز الحديد الحر ونسبة إشباع الترانسفيرين وسعة ارتباط الحديد الكلية TIBC ولم يلاحظ أية فروق معنوية في أعداد كريات الدم الحمراء, حجم مكدها الدم وتركيز الهيموكلوبين, بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

ABSTRACT

The present study was aimed of studying the effect of oxidative stress induced by iron overload on locale male rabbits and the role of vitamin E against stress, the study was carried out at the department of biology, college of education, and university of Karbala. Fifteen adult male of rabbits were divided into three equal groups (5/groups). the first group was injected with 0.5 ml normal saline and served as a control group T1. Rabbits in the second group were injected intramuscular with 15 mg/kg Iron dextran three times a week for nine weeks T2, While animals in the third group were injected with 15 mg/kg Iron dextran intramuscular three times a week and orally Vitamin E (20mg/kg) for nine weeks, Fasting blood samples are collected each three weeks for measuring the following biochemical parameters : Red blood corpuscles RBC, Packed cell volume PCV, Hemoglobin Hb, Free iron, Total iron banding capacity TIBC, Transferrin % .

The result revealed that, injection with 15 mg/kg Iron dextran for nine weeks caused a significant decrease $p < 0.05$ in RBC, PCV, Hb, and a significant increase $p < 0.05$ in Free iron, TIBC, Transferrin %. The result revealed that, injection with 15 mg/kg Iron dextran and intubation orally 20mg/kg vitamin E for nine weeks caused significant increase ($p < 0.05$) in serum Free iron, Transferrin %, TIBC. While non significant difference in RBC, PCV, Hb, was found in Compared with control group. The goal of this study is to find the effect of oxidative stress induced by iron overload in male rabbits and the role of vitamin E in reducing some affect of iron.

المقدمة Introduction

أن للعناصر النزرة Trace elements دوراً رئيسياً في أكثر الوظائف الحيوية، وهي تشكل جزءاً أساسياً لعمل الإنزيمات والهرمونات التي تشترك في تنظيم الأيض أذ يحتاجها الجسم بكميات محدودة وأي تغير في مستوياتها يؤثر سلباً على الصحة العامة⁽¹⁻³⁾. ويعد الحديد من أهم هذه العناصر أذ يلعب دوراً حيوياً في العديد من العمليات الخلوية مثل تحرير الطاقة ونقل الأوكسجين، وكذلك في بناء الحامض النووي منقوص الأوكسجين Deoxy ribonucleic acid (DNA)⁽⁴⁻¹⁾، يوجد بشكل حر في الجسم بكميات ضئيلة فيما يكون أغلبه مرتبط مع بروتين الهيموكلوبين Hemoglobin والترانسفيرين Transferrin أو مخزون في الخلايا بشكل الفيريتين Ferritin أو الهيموسيدرين Hemosiderin⁽⁵⁾.

يتواجد الحديد في الغذاء بشكلين رئيسيين هما الحديد الهيمي haem والحديد غير الهيمي non haem ومن أهم مصادره لحوم الدواجن، الأسماك، الكبد، الفاصوليا، الثمار الجافة وأغلب الخضروات ذات الأوراق الداكنة⁽⁶⁾، بالإضافة إلى فوائده الكثيرة فإن الفائض منه يكون ساماً بسبب قدرته على تحفيز تفاعلات Fenton وتكوين الجذور الحرة Free radical والتي يمكن أن تهاجم الجزيئات الحيوية الكبيرة macromolecules التي تكون واضحة في أمراض حمل الحديد كما في اضطباغ الدم الوراثي Hereditary hemochromatosis HHC⁽⁷⁾ والتلاسيميا Thalassaemia⁽⁸⁾ والاضطرابات العصبية Neurodegenerative disorders⁽⁹⁾ كذلك يعد الحديد من العوامل المسببة للأمراض القلبية التاجية (CHD) Coronary heart disease لاسيما الاحتشاء القلبي الحاد Acute myocardial infarction (AMI) أذ لوحظ أن زيادة مخازن الحديد في الجسم تزيد من احتمالية الموت نتيجة الإصابة بهذه الأمراض⁽¹⁰⁻¹¹⁾. كما أن تجمع الحديد في الأنسجة يؤدي إلى خلل في الدماغ⁽¹²⁾ والكبد⁽¹³⁾ والكلية⁽¹⁴⁾ والمفاصل⁽¹⁵⁾. نظراً لقلة الدراسات التجريبية في العراق عن تأثيرات حمل الحديد والمستحثة بالحقن العضلي لدكستران الحديد ولأهمية مضادات الأكسدة في حماية الأنسجة من ضرر الإجهاد التأكسدي التي من أهمها فيتامين (هـ) والذي يعد من الفيتامينات الذائبة في الدهون إذ له دوراً رئيساً في حماية أغشية الخلايا من ضرر الأكسدة بسبب قدرته على التغلب على التفاعلات الوسطية للأكسدة، لذلك تم اقتراح هذه الدراسة والتي تهدف إلى معرفة تأثير الإجهاد التأكسدي المستحث من فرط الحديد في ذكور الأرانب المحلية والدور الوقائي لفيتامين E ضد ضرر الأكسدة.

من خلال تأثير حمل الحديد في أعداد كريات الدم الحمر وكداس الدم وتركيز الهيموكلوبين وكذلك مستوى الحديد الحر في المصل وسعة ارتباط الحديد الكلية TIBC والنسبة المئوية لإشباع البروتين الناقل للحديد (الترانسفيرين) Transferrin.

1. طرق العمل Methods

• الحيوانات المستخدمة في الدراسة Experimental animals

استخدمت في الدراسة 15 حيوان من ذكور الأرانب المحلية معدل أوزانها 1.450 كيلو غرام. تم شرائها من الأسواق المحلية و إيوائها في أقفاص معدة لهذا الغرض، ووضعت في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية /جامعة كربلاء في أقفاص مصنوعة من الألمنيوم بإبعاد (100×70×46) وتم توفير الماء والعلف بصورة حرة وتركزت لمدة أسبوعين حتى تتأقلم مع ظروف المختبر.

• تصميم التجربة Experimental design

قسمت حيوانات التجربة عشوائياً على ثلاث مجاميع ولمدة تسعة أسابيع أذ اتبعت طريقة ومدة الحقن حسب⁽¹⁶⁾ و قد قسمت المجاميع إلى: مجموعة السيطرة T1 وحقنت عضلياً بالمحلول الفسيولوجي 0.5 مل ثلاث مرات أسبوعياً ولمدة تسعة أسابيع، إما المجموعة الثانية T2 فقد حقنت عضلياً بجرعة 15 ملغم/كغم بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعياً ولمدة تسعة أسابيع، في حين حقنت المجموعة الثالثة T3 عضلياً بجرعة 15 ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعياً +التجريع الفموي يوميا 20 ملغم/كغم لفيتامين (هـ) وحسب طريقة⁽¹⁷⁾ ولمدة تسعة أسابيع.

تم سحب 5 مل من الدم من الوريد الحافي الأذني للأرانب بعد فترة صيام 12 ساعة وبعد 48 ساعة من آخر حقن للحديد بواسطة محقنه نبيذه معقمة (كل ثلاث أسابيع) على طول فترة التجربة البالغة تسعة أسابيع ووضع الدم في أنابيب اختبار نظيفة ومن ثم وضع في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة لمدة نصف ساعة لفصل المصل ومن ثم نقل المصل إلى أنابيب اختبار نظيفة وحفظ في المجمدة لحين إجراء التحاليل، وتم الاستعانة بالبرنامج الجاهز SPSS لغرض معالجة النتائج وفق تصميم العشوائي الكامل باستخدام جدول تحليل التباين Anova table للاستدلال عن المعنوية وباستخدام اختبار اقل فرق معنوي LSD⁽¹⁸⁾.

2. الفحوص الدموية و الاختبارات الكيموحيوية:

• عدد كريات الدم الحمر :

استخدمت طريقة الـ (Haemocytometer) بحسب ما ورد في (19) إذ تم حساب عدد الكريات الدموية الحمراء لكل مليمتري مكعب واحد من الدم .

• قياس الهيموكلوبين (Hb) :

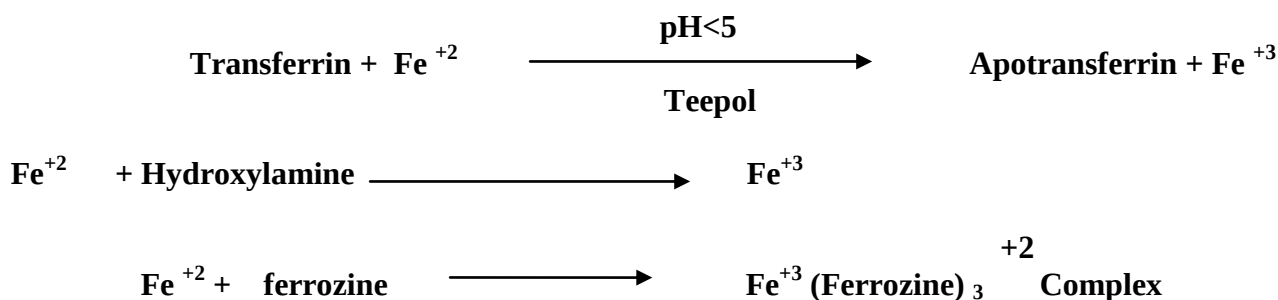
تم قياس الهيموكلوبين باستخدام طريقة سالي (Sahli) ، وأساس هذه الطريقة هي تحول خضاب الدم إلى هيماتين حامضي ، والناتج من تفاعل حامض الهيدروكلوريك 1% (HCl) المضاف ، وبعد تخفيف هذا المزيج بالماء المقطر يقارن مع اللون القياسي للجهاز وتحسب القيمة بالغرام / 100 مل من الدم (20) .

• قياس حجم الخلايا المرصوصة (PCV):

استخدمت طريقة المكاس الدقيقة (Microhaematocrit) باستعمال الأنابيب الشعرية (Capillary tubes) واستخدم جهاز المنبذة الخاص لحجم الخلايا المرصوصة (Microhaematocrit centrifuge) ، ثم قرأت النتيجة بواسطة المسطرة الخاصة PCV (reader) ، وحسبت النتيجة بالنسبة المئوية (%) (20) .

• تقدير تركيز الحديد في المصل:- Determination of serum iron concentration

تم قياس تركيز الحديد في مصل الدم باستخدام عدة التقدير الجاهزة Kit والمجهزة من شركة linear وحسب المبدأ التالي:-
الحديد Fe^{+3} المرتبط مع بروتين ferritin في المصل ينفصل في الوسط الحامضي الضعيف بمساعدة Teepol & guanidium chlorid ثم يختزل بواسطة hydroxylamine إلى الحديدوز Fe^{+2} مكون أيون الحديد الثنائي كمعقد لوني نسبياً مع ferrozine والذي من خلاله نستطيع تحديد تركيز الحديد في النموذج حسب المعادلات الآتية:-



وأجريت التجربة كما يأتي:-

أنبوبة القياسي Standard	العينة Sample	كفؤ النموذج Serum blank	كفؤ الكاشف Reagent blank	الأنابيب
-	-	-	200µl	ماء مقطر Distal water
-	200µl	200µl	-	النموذج Sample
200µl	-	-	-	محلول القياسي Standard
-	-	1.0 ml	-	الكاشف المستخدم R1
1.0 ml	1.0 ml	-	1.0ml	خليط الكواشف R1+R2

ملاحظة:- يحضر خليط الكواشف أنيا من مزج (4 أحجام من R1 + 1 حجم من R2) بعد مزج محتويات الأنابيب جيداً، تترك لمدة 5 دقائق ثم تؤخذ الامتصاصية لها عند الطول الموجي 560 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer. إذ تتم قراءة الامتصاصية لمحلول كفؤ النموذج مقابل امتصاصية أنبوبة الماء المقطر ثم تقرأ امتصاصية أنابيب العينة وأنبوبة المحلول القياسي مقابل أنبوبة محلول كفؤ الكاشف. ويتم حساب تركيز الحديد وفقاً للصيغة الآتية:

تركيز الحديد مايكرو غرام/100 مل =

الامتصاص الضوئي لعينة المصل - الامتصاص الضوئي لعينة محلول الكفؤ

× تركيز المحلول القياسي

الامتصاص الضوئي للمحلول القياسي

● تقدير سعة ارتباط الحديد الكلية في المصل:- Determination of total iron binding capacity (TIBC) in serum

تم تحديد تركيز TIBC في المصل باستخدام عدة التقدير الجاهزة Kit والمجهزة من شركة linear وحسب المبدأ التالي:-
حديد المصل المرتبط مع Transferrin يكون مشبع فقط لثالث مناطق ارتباط الحديد بالبروتين و هناك مناطق غير مشبعة بالحديد (UIBC) لها القابلية على الارتباط عند توفر الحديد.
يقاس TIBC أولاً بواسطة إشباع Transferrin من خلال تزويده بالحديد Fe^{+3} وما يتبقى من الحديد يمتص مع كربونات المغنسيوم وعند اكتمال عملية الربط والالتحام يزال بواسطة عملية الطرد المركزي ونقيس إشباع الحديد المتكون في المحلول.
الكواشف:-

- أ. R1 محلول الحديد (500 مايكرو غرام/مل دم)
- ب. R2 مسحوق كربونات المغنسيوم

طريقة العمل:-

1	العينة = النسبة =	0.5 ml	العينة Sample
2	معامل التخفيف = 3	1.0 ml	كاشف R1
	كاشف R1		

- أ. تمزج الأنابيب جيداً وتترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة .
 - ب. نضيف ملعقة واحدة من كاشف R2 "حوالي 100 ملغم" لكل أنبوبة وتترك لمدة 30 دقيقة بحرارة الغرفة.
 - ج. تمزج الأنابيب بجهاز المازج Vortex بشدة بفترات منتظمة كل 5 دقائق ولمدة 30 دقيقة.
 - د. توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 3000 دورة/دقيقة .
- ثم تقاس الامتصاصية للسائل الطافي على طول الموجي 560 نانوميتر .

الحسابات:-

سعة ارتباط الحديد الكلية

$$\text{TIBC (مايكرو غرام/100مل)} = \frac{\text{الامتصاصية للعينة} \times \text{تركيز محلول القياسي}}{\text{معامل التخفيف} \times \text{الامتصاصية للمحلول القياسي}}$$

• حساب النسبة المئوية لإشباع ناقل الحديد الترانسفيرين % Transferrin

$$\text{النسبة المئوية للإشباع \%} = \frac{\text{تركيز الحديد في المصل} \times 100}{\text{TIBC}}$$

النتائج

يلاحظ من الجدول (1) وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل تركيز الهيموكلوبين Hb في المجموعة T2 المعاملة بتجربة 15 ملغم/كغم دكستران الحديد في الأسبوع الثالث واستمر هذا الانخفاض طول مدة التجربة كما يشير الجدول إلى إن التجريع الفموي لفيتامين (هـ) أدى إلى عدم وجود تغير معنوي في معدل تركيز الهيموكلوبين Hb في المجموعة T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. فيما يلاحظ من الجدول (2) وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات حجم مكدها الدم (%) في المجموعة المعرضة لفرط الحديد في الأسبوع الثالث واستمر هذا التغير طول فترة التجربة كما يشير الجدول إلى عدم وجود تأثير معنوي للفترة الزمنية. كما يشير الجدول إلى إن التجريع الفموي بفيتامين (هـ) أدى إلى عدم وجود تغير معنوي في معدل مستويات حجم مكدها الدم (%) في المجموعة T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

كذلك يلاحظ من الجدول (3) وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات أعداد كريات الدم في الأسبوع السادس والتاسع في المجموعة المعرضة لفرط الحديد بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. كما أن التجريع الفموي بفيتامين (هـ) أدى إلى عدم وجود تغير معنوي في معدل مستويات أعداد كريات الدم الحمراء في المجموعة T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

وقد لوحظ في الجدول (4) وجود ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في مستوى تركيز الحديد في المجموعة T2 المحقونة بجرعة 5 ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1 في الأسبوع الثالث واستمر هذا الارتفاع على طول فترة التجربة. كذلك يبين الجدول ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في مستوى الحديد الحر في المصل في مجموعة الحيوانات المجرعة بـ 20 ملغم/كغم من وزن الجسم بفيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد، كما يشير الجدول إلى عدم وجود تأثير معنوي للفترة الزمنية.

كما يشير الجدول (5) إلى وجود ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات نسبة إشباع الترانسفيرين في المجموعة T2 والمحقونة بجرعة 20 ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1 في الأسبوع

الثالث، واستمر هذا الارتفاع طول فترة التجربة. كذلك يشير الجدول إلى وجود ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات إشباج الترانسفيرين في الحيوانات المجرعة بـ 20 ملغم/كغم فيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد T3 خلال فترة التجربة إذ كانت القيم 70.3 و 71.04 و 68.97 وعلى التوالي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1. ويوضح الجدول (6) إلى وجود ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) معدل مستويات سعة ارتباط الحديد الكلية TIBC في المجموعة T2 و المحقونة بـ 15 ملغم/كغم دكستران الحديد بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1 في الأسبوع الثالث، واستمر هذا الارتفاع طول مدة التجربة. كما يشير الجدول إلى وجود ارتفاع في معدل مستويات سعة ارتباط الحديد الكلية TIBC في المجموعة المجرعة بـ 20 ملغم/كغم من وزن الجسم بفيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد.

جدول (1) تأثير فيتامين (هـ) على مستويات معدل تراكيز الهيموكلوبين Hb (غرام/100 مل دم) في مصّل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجماع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15 ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين (هـ)
الأسبوع الثالث	13.25 ±0.27 A a	11.93 ±0.32 B a	13.41 ±0.36 A a
الأسبوع السادس	13.31 ±0.21 A a	11.71 ±0.3 B a	13.69 ±0.32 A a
الأسبوع التاسع	12.96 ±0.33 A a	11.02 ±0.38 B a	12.23 ±0.37 A a

المعدل ± الخطأ القياسي، $n = 5$ مجموعة

الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية أفقياً تحت مستوى $P < 0.05$

الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى $P < 0.05$

جدول (2) تأثير فيتامين (هـ) على معدل مستويات حجم مكّداس الدم (%) في مصّل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجماع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15 ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين (هـ)
الأسبوع الثالث	42 ±0.96 A a	39 ±0.66 B a	41.88 ±0.78 A a
الأسبوع السادس	41.5 ±0.21 A a	38.7 ±0.3 B a	41.70 ±0.48 A a
الأسبوع التاسع	41.37 ±0.53 A a	39.15 ±0.78 B a	41.02 ±0.53 A a

المعدل ± الخطأ القياسي، $n = 5$ مجموعة

الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية أفقياً تحت مستوى $P < 0.05$

الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى $P < 0.05$

جدول (3) تأثير فيتامين (هـ) على معدل مستويات أعداد كريات الدم الحمر $10^6 / \text{mm}^3$ كرية في مصل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجاميع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين(هـ)
الأسبوع الثالث	6.08 ± 0.13 A a	5.6 ± 0.41 A a	5.8 ± 0.15 A a
الأسبوع السادس	6.15 ± 0.18 A a	5.42 ± 0.15 B a	5.55 ± 0.16 A a
الأسبوع التاسع	6.11 ± 0.16 A a	5.27 ± 0.18 B b	5.76 ± 0.19 A a

المعدل $\pm$ الخطأ القياسي, n=5/مجموعة

الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية افقياً تحت مستوى $P < 0.05$

الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى $P < 0.05$

جدول(4) تأثير فيتامين (هـ) على معدل مستويات الحديد (مايكروغرام/100مل) في مصل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجاميع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين(هـ)
الأسبوع الثالث	116.8 ± 13.12 A a	271.40 ± 28.63 B a	264.67 ± 45.38 B a
الأسبوع السادس	112.0 ± 13.94 A a	312.60 ± 25.56 B a	278.60 ± 23.1 B a
الأسبوع التاسع	115.80 ± 13.52 A a	351.58 ± 46.78 B a	281.40 ± 45.56 B a

المعدل $\pm$ الخطأ القياسي, n=5/مجموعة

الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية افقياً تحت مستوى $P < 0.05$

الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى $P < 0.05$

جدول (5) تأثير فيتامين (هـ) على معدل مستويات سعة ارتباط الحديد الكلية TIBC (مايكروغرام/100مل) في مصّل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجاميع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين (هـ)
الأسبوع الثالث	261.40 ±39.89 A a	430.60 ±53.37 B a	376.42 ±55.11 B a
الأسبوع السادس	248.80 ±23.35 A a	415.6 ±44.73 B a	392.20 17.18 B a
الأسبوع التاسع	254.0 ±45.49 A a	442.60 ±32.11 B a	408.0 ±70.82 B a

المعدل ± الخطأ القياسي, n = 5/مجموعة
الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية أفقياً تحت مستوى P<0.05
الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى P<0.05

جدول (6) تأثير فيتامين (هـ) في معدل مستويات إشباع % Transferrin (مايكروغرام/100مل دم) في مصّل ذكور الأرانب المعرضة لفرط الحديد ولمدة تسعة أسابيع

المجاميع المدة (الأسبوع)	T1 السيطرة	T2 15ملغم/كغم iron dextran	T3 15 ملغم/كغم iron dextran 20+ ملغم/كغم فيتامين (هـ)
الأسبوع الثالث	44.68 ± 5.57 A a	63.02 ±4.4 B a	70.30 ±3.41 B a
الأسبوع السادس	45.02 ±4.12 A a	75.21 ±4.85 B a	71.04 ±4.27 B a
الأسبوع التاسع	45.59 ±5.24 A a	79.49 ±5.43 B a	68.97 ±5.81 B a

المعدل ± الخطأ القياسي, n = 5/مجموعة
الحروف الكبيرة تدل على وجود فروق معنوية أفقياً تحت مستوى P<0.05
الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عمودياً تحت مستوى P<0.05

المناقشة Discussion

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في أعداد كريات الدم الحمر (RBC) بعد الحقن العضلي بدكستران الحديد iron dextran مقارنة بمجموعة السيطرة ، أما بالنسبة لمكداس الدم وتركيز الهيموكلوبين فقد لوحظ أيضا انخفاض في قيمها وهي نتائج متفقة مع (16-10).

أذ يبدو أن مخازن الحديد في كريات الدم (الهيموكلوبين) قد أشبعت منذ بداية الحقن بدكستران الحديد وان تكرار الحقن يؤدي إلى إضرار معاكسة في كريات الدم الحمر نتيجة تحرير الجذور الحرة والتي تؤثر على أغشية كريات الدم الحمر مما يؤدي إلى تكسرها وتحللها في مجرى الدم وبالتالي انخفاض في معدلات إعداد كريات الدم وحجم المكداس ونسبة الهيموكلوبين إذ أن هناك علاقة طردية بين الهيموكلوبين وحجم خلايا الدم المرصوفة وهذا يؤكد ما أشار (21) من أن هناك علاقة طردية بين معدل مستويات الهيموكلوبين وحجم خلايا الدم المرصوفة وأن كلاً منهما يؤكد الآخر في مستوياتها في الدم. وربما يعود هذا الانخفاض إلى إشباع الترانسفيرين إذ تحدث زيادة في الحديد الثلاثي والذي يتحرر في المصل نتيجة الحقن المستمر بدكستران الحديد ويشارك في تفاعلات غير مسيطر عليها (غير منتظمة) إذ أن أيون الحديد ليس له القابلية على نقل الأوكسجين لذلك ستحدث قلة في معدلات الأوكسجين المنقولة ، الأمر الذي يؤدي بدوره إلى تقليل معدلات بقاء survival rate كريات الدم الحمر التي تدور في مجرى الدم وهذا يتفق مع ما جاء به (22) ، وعليه فإن النقص في إعداد كريات الدم الحمر يسبب فقداناً للدم ومن ثم تخفيفه وبالتالي تقليل قيم PCV .

من جهة أخرى لاحظ (23) إن الانخفاض في إعداد RBC و Hb و PCV يحصل نتيجة تهشم جدار كرية الدم الحمراء من خلال تأثير العناصر الثقيلة على الدهون والبروتينات المكونة للجدار وكذلك التأثير على نفاذية الغشاء .

فيما أشارت بعض المصادر إلى دور فرط الحديد في تحرير الجذور الحرة والتي تؤدي إلى تثبيط أنزيم Glutathione peroxidase المتحرر من الكبد وهذه المادة تعمل على الحفاظ على مستوى الهيموكلوبين في داخل كرية الدم الحمراء وكما يعمل على تثبيط إنزيم Glutathione peroxidase المهم في إزالة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لذا فإن تثبيط هذا الإنزيم يعمل على التقليل من عمر الكرية وهذا اتفق مع (24-25).

أو أن تكرار الحقن يؤدي إلى فرط للحديد Iron overload وهذا الحديد يتجمع في خلايا الشبكية البطانية Reticuloendothelial cells والخلايا السائدة parenchymal cells لنخاع العظم مما يسبب ضرر نسجي له من خلال تكوين الجذور الحرة وتحطيم العضيات داخل خلوية وال DNA والأغشية الخلوية (26). كما أظهرت النتائج أن سمية الحديد حدثت بعد ثلاثة أسابيع من إجراء التجربة متفقة مع (27) الذي بين إن سمية الحديد hyperferraemia تحدث عند المعالجة بدكستران الحديد بالحقن العضلي خلال مدة ثلاثة أسابيع ولا تظهر أعراض السمية عند اخذ ملاحق الحديد فموياً خلال هذه المدة.

وأظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات الحديد في المصل ونسبة إشباع الترانسفيرين سعة ارتباط الحديد الكلية في حيوانات التجربة كما موضح في الجداول (4و6و5). وهي نتائج متفقة مع (13-28). إن الزيادة في الحديد الحر قد تعود إلى الجهد التأكسدي العالي في الحيوانات التي يحرر فيها الحديد جذور حرة مما يؤدي إلى استنزاف من احتياطي مضادات الأكسدة (30) ، إذ يتراكم الحديد نتيجة الحقن المستمر ونتيجة لعدم وجود ممر فسيولوجي رئيس لطرحة من الجسم مما يؤدي إلى تجمع هذا العنصر في كل أعضاء الجسم لاسيما في الكبد والقلب والطحال (29). فيما تعود الزيادة في سعة ارتباط الحديد الكلية بسبب أن زيادة مستويات الحديد في البلازما يحفز الكبد على بناء بروتين الناقل للحديد (الترانسفيرين) لأجل التخلص من الحديد الفائض أما الزيادة في نسبة إشباع الترانسفيرين فهو التغير الأول الذي يدل على تطور حمل الحديد في الأنسجة حيث ذكر (30) ، إن مصل الدم في مرضى التلاسيميا يمكن أن يحتوي حديد غير مرتبط بالترانسفيرين وهذا الحديد يمكن أن يستحث أكسدة الدهون Lipid peroxidation ولاحقاً استهلاك مضادات الأكسدة.

كما أشارت نتائج الدراسة الحالية أن فيتامين (هـ) قلل من تأثيرات حمل الحديد على أعداد كريات الدم الحمر وحجم مكداس الدم وتركيز الهيموكلوبين ، وهي نتائج متفقة مع (31-32) اللذان بينا إن لإضافة فيتامين (هـ) دور في التخفيف من ضرر الأكسدة في كريات الدم الحمر إذ يستطيع فيتامين (هـ) من حماية الأحماض الدهنية من ضرر الأكسدة إذ لوحظ إن الجزيئة الواحدة من التوكوفيرول تستطيع حماية ما يقارب 10^7 جزيئة من الأحماض الدهنية غير المشبعة في مستويات البيروكسيد المنخفضة . فيما تصل نسبة التوكوفيرول إلى حامض الراكودونيك Arachidonic acid في أغشية كريات الدم الحمر من 500:1 وهي نسبة كافية لقطع التفاعلات المتسلسلة للجذور الحرة التي يحررها فرط الحديد ، وهذا دليل على أن فيتامين (هـ) له دور في المحافظة على مستوى الهيموكلوبين وهذا يؤكد ما أشار إليه (33).

أظهرت النتائج الحالية ارتفاعاً معنوياً عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل مستويات الحديد في المصل ونسبة إشباع الترانسفيرين % Transferrin و معدل مستويات سعة ارتباط الحديد الكلية TIBC في الأرانب المحملة بالحديد على الرغم من إضافة فيتامين (هـ) كما موضح في الجداول (4و5و6) وهي نتائج متفقة مع الدراسات التي أجريت من قبل (34-36). التي لاحظت عدم تأثير إضافة مضادات الأكسدة على مستويات معايير الحديد في الحيوانات المجرعة بمركبات الحديد ، هذه الزيادة في معايير الحديد قد تعود إلى الحقن المستمر للحديد iron dextran وهذا الحديد قد يتجاوز قدرة مضادات الأكسدة (30) كما ذكرت دراسة

أخرى⁽³⁶⁾ بأن تأثير الفيتامينات يكون محدود في حمل الحديد ولفترة وجيزة وكلما طالت الفترة فان جرعة الفيتامينات لاتستطيع التخفيف من ضرر الحديد.

المصادر References

1. Hentze, M.W.; Muckenthaler, M.U. and Andrews N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.*, **117**:285-297.
2. Richardson, DR.(2002). Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.*, **42**:267-281.
3. Lieu, PT.; Heiskala, M.; Peterson, PA. and Yang, Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Mol Aspect Med.*, **22**:1-87.
4. Beard J.L. (2001).Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.*, **131**:568S–80S.
5. Franchini, M.; Targher, G.; Montagnana, M. and Lippi, G. (2008). Iron and Thrombosis. *Ann. Hematol.*, **87**:167–73.
6. Conrad, M.E.; Umbreit, J.N. and Moore, E.G. (1999). Iron absorption and transport. *Am..J. Med. Sci.*, **18**:213-229.
7. Porto, G. and De Sousa, M. (2007) Iron overload and immunity. *World J. Gastroenterol.*, **13**(35): 4707-4715.
8. Ghone,R.A.; Kumbar,K.M.; Suryakar,A.N.; Katkam ,R.V. and Joshi, N. G.(2008). Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta Thalassemia major Ind. *J. Clin. Biochem.*, **23** (4) :337-340.
9. Napier, I.; ponka, P. and Richardson, DR. (2005). Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood.*, **105**:1870-1874.
10. Afroditi, H. (2006). Correlative study of iron accumulation in liver, myocardium, and pituitary assessed with MRI in young thalassemic patients. *Pediatric .Hematol. Oncol.*, **28** (5).
11. Turoczi, T.; Jun, L.; Cordis, G.; Morris, J. E.; Maulik, N.; Stevens, R. G. and Das, D. K. (2003). HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ. Res.*, **92**: 1240–1246.
12. (12)Zecca, L.; Youdim, M.B.; Riederer, P.; Connor, J.R. and Crichton, R.R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosis.*, **5**: 863– 873.
13. Park, C. H.; Valore, E. V.; Waring, A. J. and Ganz, T. (2001). Hephcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, **276**: 7806–7810
14. Deicher, R.; Ziai, F.; Cohen, G.; Mullner, M. and Horl, W.H.(2003). High dose parenteral iron sucrose depresses neutrophils intracellular killing capacity. *Kidney Int.*, **64**: 728–736.
15. (15)Takatoku, M.; Uchiyama, T. and Okamoto, S. (2007).Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur. J. Haematol.*, **78**:487–494.
16. Dabbagh, A. J. ; Shwaery, G. T. ; Keaney, J. F. and Frei, B. (1997).effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemia rabbit. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**: 2638–2645.
17. Giacosa, A.; Filiberti, R.; Hill, M. J. and Faivre, J. (1997). Vitamins and cancer chemoprevention. *Eur. J. cancer Prev.*, **6** :547-554.
18. (18)Steel,R. and Torries, J. (1980). Principles and Procedures Statistics a biometrical Approach. 2nd (ed) .Mc .Jan.44-48.

19. Gregg, L. V. (2000). Hematology Techniques And concepts for veterinary techniques. 1st (ed). Iowa State Univ. Press. 97-100.
20. Jain, N. C. (1986). Schalm's Veterinary Hematology. 4th. (ed). Lea and Fibiger Philadelphia.
21. Cornejo, P.; Varela, P.; Videla, L.A. and Fernandez, V. (2005). Chronic iron overload enhances inducible nitric oxide synthases expression in rat liver. Nitric Oxide., **13**: 54–61.
22. Kaneko, J.J.; Harvey, J.W. and Bruss, M.L. (1997). Clinical biochemistry of domestic animals. 5th (ed). Academic press. London. PP: 932.
23. Demir, S. and Öner, G. (1995). The effect of cadmium on the fragility of red blood cell. J. Isl. Aca. of sci., **8**(2). PP: 73-78.
24. Fair, G. P. (2003). Toxic effect of lead on hypothalamic-pituitary-axis. Circ. Res., **92**: 124–129.
25. Vander, A.; Sherman, J. and Luciano, D. (2001). Human Physiology; The Mechanisms of Body Function. 8th (ed). McGraw-Hill Higher Education. pp 698.
26. Ng, P.C.; Lam, C.W.; Lee, C.H.; To, K.F.; Fok, T.F.; Chan, I.H.S. and Wong, E. (2001). Hepatic Iron Storage in Very Low Birth Weight Infants after Multiple blood transfusions. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed., (84): F101-F105.
27. Oppenheimer, S. J. (1998) Iron and infection in the tropics: pediatric clinical correlates. Ann. Trop. Paediatr., **18**: S81–S87.
28. Turbino-Ribeiro, S.M.L.; Silva, M.E.; Chianca, D.A.; Depaula, H.; Cardoso, L.M. and Pedrosa, M.L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. J. Nutr., **133**: 15-20.
29. Bullen, J.J.; Spaulding, P.B., Ward, G.G and Cutteridge, J. M.C. (1991). Iron binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. Am. J. Clin. Nutr., (151): 1606-1609.
30. جواد، علاء حسين. (2005). دراسة لبعض المتغيرات الكيميائية عند مرضى التلاسيميا (فقر دم البحر الأبيض المتوسط). أطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة بغداد.
31. Koyu, A.; Ozguner, F.; Caliskan, S. and Karaca, H. (2005). Preventive effect of vitamin E on iron-induced oxidative damage in rabbit. Toxic. Ind. Health., **21**: 239-242.
32. Diplock, A. T.; Charleux, J. L.; Grozier, Will, G.; Kok, F. T., Evans, R.; Roberforid, M.; Stable, W. And Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. British J. Nutr., **80**. (Suppl.1): 570.
33. Hales, J.R. and Fawcett, A.A. (1993). Wool production and blood supply to skin and other tissues in sheep. J. Anim. Sci., **71**(2): 422-429.
34. (34) Chen, K. ; Jung, S. ; Anitra, C. C. ; Jason, D. M. ; John, Z. and Balz, F.G. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage *in vivo* even in the presence of iron overload. Am. J. Physiol Endocrinal Metab., **279**: E1406–E1412 .
35. Asare, G.A.; Paterson; A.C., Kew, M.C.; Khan, S. and Mossanda, K.S.A. (2006). Iron-free neoplastic nodules and hepatocellular carcinoma without cirrhosis in Wistar rats fed a diet high in iron. J. Pathol., **208**(1): 82–90.
36. Asare, G.A. ; Kew, M.C. ; Kensese, S. ; Mossanda K.S. ; Paterson A.C. ; Siziba, K. and Christiana, P. K. (2009). Effects of, exogenous antioxidants on Dietary Iron Overload J. Clin. Biochem. Nutr., **44**: 85–94.