# 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 تأثيرالإجهاد 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 كليـة التربيـة /جامعـة كربـلاء و تم استخدام 15حيوان من ذكور الأرانب البالغة والتي قسمت عشوائيا على ثلاث مجاميع (خمسة حيوانات لكل مجموعة) حيث حقنت المجموعة الأولى 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي وعدت كمجموعة سيطرةT1, أما المجموعة الثانيةT2 فقد حقنت عضلياً ب15ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد Iron dextran ثلاث مرات أسبوعيا, في حين حقنت المجموعة الثالثة T3 ب15ملغم/كغم عضلياً بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعيا مع التجريع الفموي لفيتامين (هـ) بجرعة 20ملغم/كغم يوميا وعلى طول مدة التجربة البالغة تسعة أسابيع.

جمعت عينات الدم في الأسبوع الثالث و السادس والتاسع لقياس المعايير التالية:-عدد كريات الدم الحمر Red blood corpuscles (RBC), حجم مكداس الدم Packed cell volume(PCV) , تركيز الهيموكلوبين Hemoglobin(Hb) و تركيز الحديد الحرFree iron وسعة ارتباط الحديد الكلي Total iron banding capacity (TIBC)والنسبة المئوية لإشباع البروتين الناقل للحديد (الترانسفرين) Transferrin .

أظهرت نتائج المجموعة المعاملة بالحقن العضلي لدكستران الحديد حدوث انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية $P<0.05$ في أعداد كريات الدم الحُمر 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 الترانسفرين 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 الترانسفرين وسعة ارتباط الحديد الكلية TIBC ولم يلاحظ أية فروق معنوية في أعداد كريات الدم الحمر, حجم مكداس الدم و تركيز 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 رئيسيا في أكثر الوظائف الحيوية, وهي تشكل جزءا اساسياً لعمل الإنزيمات والهرمونات التي تشترك في تنظيم الأيض أذ يحتاجها الجسم بكميات محدودة وأي تغير في مستوياتها يؤثر سلبا على الصحة العامة [1-2-3]. ويعد الحديد من أهم هذه العناصر أذ يلعب دوراً حيوياً في العديد من العمليات الخلوية مثل تحرير الطاقة, ونقل الأوكسجين, وكذلك في بناء ألحامض النووي منقوص الأوكسجين Deoxy ribonucleic acid (DNA) [1-4], يوجد بشكل حر في الجسم بكميات ضئيلة فيما يكون اغلبه مرتبط مع بروتين الهيموكلوبين Hemoglobin والترانسفرين Transferrin اومخزون في الخلايا بشكل الفرتين Ferritin اوالهيموسدرين Hemosiderin [5].

يتواجد الحديد في الغذاء بشكلين رئيسين هما الحديد الهيمي haem والحديد غير الهيمي non haem ومن أهم مصادره لحوم الدواجن ,الأسماك,الكبد,الفاصوليا,الثمار الجافة واغلب الخضروات ذات الأوراق الداكنة [6], بالإضافة إلى فوائده الكثيرة فإن الفائض منه يكون ساماً بسبب قدرته على تحفيز تفاعلات Fenton وتكوين الجذور الحرة Free radicalوالتي يمكن أن تهاجم الجزيئات الحيوية الكبيرة macromolecules التي تكون واضحة في أمراض حمل الحديد كما في اصطباغ الدم الوراثي Hereditary hemochromatosis HHC [7] الثلاسيميا Thalassemia [8] والاضطرابات العصبية Neurogenerative disorders [9]

كذلك يعد الحديد من العوامل المسببة للإمراض القلبية التاجية Coronary heart disease (CHD) لاسيما الاحتشاء القلبي الحاد Acute myocardial infarction( AMI) أذ لوحظ أن زيادة مخازن الحديد في الجسم تزيد من احتمالية الموت نتيجة الإصابة بهذه الإمراض [10-11]. كما أن تجمع الحديد في الأنسجة يؤدي إلى خلل في الدماغ[12] والكبد [13] والكلية [14] والمفاصل [15].

نظرا لقلة الدراسات التجريبية في العراق عن تأثيرات حمل الحديد والمستحثة بالحقن العضلي لدكستران الحديد ولأهمية مضادات الأكسدة في حماية الأنسجة من ضرر الإجهاد التاكسدي التي من أهمها فيتامين (هـ) والذي يعد من الفيتامينات الذائبة في الدهون إذ له دوراً رئيسا 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 و الدور الوقائي لفيتامين E ضد ضرر الأكسدة .

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

## 1. طرائق 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 وتركت لمدة أسبوعين حتى تتأقلم مع ظروف المختبر .

- **تصميم التجربة Experimental design**

قسمت حيوانات التجربة عشوائيا على ثلاث مجاميع ولمدة تسعة أسابيع أذ اتبعت طريقة ومدة الحقن حسب [16] و قد قسمت المجاميع إلى :مجموعة السيطرة T1 وحقنت عضلياً بالمحلول الفسيولوجي0.5 مل ثلاث مرات أسبوعيا ولمدة تسعة أسابيع ,إما المجموعة الثانية T2 فقد حقنت عضلياً بجرعة 15ملغم/كغم بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعيا ولمدة تسعة أسابيع ,في حين حقنت المجموعة الثالثة T3 عضلياً بجرعة 15ملغم/كغم من وزن الجسم بدكستران الحديد ثلاث مرات أسبوعيا +التجريع الفموي يوميا 20ملغم/كغم لفيتامين(هـ)وحسب طريقة[17] ولمدة تسعة أسابيع .

تم سحب5 مل من الدم من الوريد الحافي الاذني للأرانب بعد فترة صيام 12 ساعة وبعد 48 ساعة من أخر حقن للحديد بوساطة 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 مليمتر 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 المكداس الدقيقة (Microhaematocrit) باستعمال الأنابيب الشعرية (Capillary tubes) واستخدم جهاز المنبذة الخاص لحجم الخلايا المرصوصة (Microhaematocrit centrifuge) ، ثم قرأت النتيجة بوساطة 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 شركةlinear وحسب المبدأ التالي:-

الحديديك $Fe^{+3}$ المرتبط مع بروتين ferritin في المصل ينفصل في الوسط الحامضي الضعيف بمساعدة Teepol & guanidium chlorid ثم يختزل بواسطة hydroxylamine إلى الحديدوز $Fe^{+2}$ مكون ايون الحديد الثنائي كمعقد لوني نسبيا مع ferrozine والذي من خلاله نستطيع تحديد تركيز الحديد في النموذج حسب المعادلات الآتية :-

$$\text{Transferrin} + Fe^{+2} \xrightarrow[\text{Teepol}]{pH<5} \text{Apotransferrin} + Fe^{+3}$$

$$Fe^{+2} + \text{Hydroxylamine} \longrightarrow Fe^{+3}$$

$$Fe^{+2} + \text{ferrozine} \longrightarrow Fe^{+3}(\text{Ferrozine})_3^{+2} \quad \text{Complex}$$

**وأجريت التجربة كما يأتي:-**

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

ملاحظة:- يحضر خليط الكواشف أنيا من مزج(4احجام من R1+1حجم من R2)

بعد مزج محتويات الأنابيب جيداً, تركت لمدة 5 دقائق ثم تؤخذ الامتصاصية لها عند الطول ألموجي 560 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئيspectrophotometer . 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/100مل =**

$$\frac{\text{الامتصاص الضوئي لعينة المصل - الامتصاص الضوئي لعينة محلول الكفؤ}}{\text{الامتصاص الضوئي للمحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

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

تم تحديد تركيز TIBC في المصل باستخدام عدة التقدير الجاهزةKit والمجهزة من شركةlinear وحسب المبدأ التالي:-

حديد المصل المرتبط مع Transferrin يكون مشبع فقط لثلث مناطق ارتباط الحديد بالبروتين و هناك مناطق غير مشبعة بالحديد(UIBC) لها القابلية على الارتباط عند توفر الحديد .

يقاس TIBC أولا بواسطة اشباع 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 (500مايكروغرام/مل دم)

ب. **R2** مسحوق كربونات المغنسيوم

**طريقة العمل:-**

| العينة Sample | 0.5 ml | النسبة = العينة / كاشف R1 = 1/2 ، معامل التخفيف =3 |
|---|---|---|
| كاشف R1 | 1.0 ml | |

أ. تمزج الأنابيب جيدا وتترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة .

ب. نضيف ملعقة واحدة من كاشف R2 "حوالي 100ملغم" 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 3000دورة/دقيقة .

ثم تقاس الامتصاصية للسائل الطافي على طول ألموجي 560 نانوميتر .

**الحسابات:-**

**سعة ارتباط الحديد الكلية**

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

- **حساب النسبة المئوية لإشباع ناقل الحديد الترانسفرين 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 الهيموكلوبينHb في المجموعة T2 المعاملةبجرعة15ملغم/كغم دكستران الحديد في الأسبوع الثالث و استمر هذا الانخفاض طول مدة التجربة, كما يشير الجدول إلى إن التجريع الفموي لفيتامين (هـ) أدى إلى عدم وجود تغير معنوي في معدل تركيز الهيموكلوبين Hbفي المجموعة T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .فيما يلاحظ من الجدول (2) وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية (P<0.05) في معدل مستويات حجم مكداس الدم (%) في المجموعة المعرضة لفرط الحديد في الأسبوع الثالث وأستمر 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 مكداس 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 الحمرفي 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 بجرعة15ملغم/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 ب20ملغم/كغم من وزن الجسم بفيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد, كما يشير الجدول إلى عدم وجود تأثير معنوي للمدة الزمنية.

كما يشير الجدول(5) إلى وجود ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية (P<0.05) في معدل مستويات نسبة إشباع الترانسفرين في المجموعة T2 والمحقونة بجرعة 20ملغم/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<.050) في معدل مستويات إشباع الترانسفرين في الحيوانات المجرعة ب20ملغم/كغم فيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد T3 خلال فترة التجربة إذ كانت القيم 70.3و71.04و68.97 وعلى التوالي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1. ويوضح الجدول(6) إلى وجود ارتفاع معنوي (P<0.05) معدل مستويات سعة ارتباط الحديد الكليةTIBC في المجموعة T2 و المحقونة ب15ملغم/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 الكليةTIBC في المجموعة المجرعة ب20ملغم/كغم من وزن الجسم بفيتامين (هـ) والمعرضة لفرط الحديد.

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

| المجاميع / المدة (الأسبوع) | T1 السيطرة | T2 iron dextran 15ملغم/كغم | T3 irondextran 15 ملغم/كغم +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 افقياً تحت مستوى P<0.05**
**الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عموديا تحت مستوى P<0.05**

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

| المجاميع / المدة (الأسبوع) | T1 السيطرة | T2 iron dextran 15ملغم/كغم | T3 irondextran 15 ملغم/كغم +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 افقياً تحت مستوى P<0.05**
**الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عموديا تحت مستوى P<0.05**

جدول (3) تأثير فيتامين (هـ) على معدل مستويات أعداد كريات الدم الحمر $mm^3$/ $10^6$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 irondextran +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 ± الخطأ القياسي, n =5/مجموعة

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

الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عموديا 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 irondextran +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 ± الخطأ القياسي, n =5/مجموعة

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

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

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

| المجاميع / المدة (الأسبوع) | T1 السيطرة | T2 iron dextran15ملغم/كغم | T3 irondextran15 ملغم/كغم +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 افقياً تحت مستوى P<0.05
الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عموديا تحت مستوى P<0.05

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

| المجاميع / المدة (الأسبوع) | T1 السيطرة | T2 iron dextran15ملغم/كغم | T3 irondextran15 ملغم/كغم +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 افقياً تحت مستوى P<0.05
الحروف الصغيرة تدل على وجود فروق معنوية عموديا 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 الحُمر (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 [10-16] .

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 المرصوصة وهذا يؤكد ما أشار [21] من أن هناك علاقة طردية بين معدل مستويات الهيموكلوبين وحجم خلايا الدم المرصوصة وأن كلاً منهما يؤكد الآخر في مستوياتهما في الدم, وربما يعود هذا الانخفاض إلى إشباع الترانسفرين إذ تحدث زيادة في الحديد الثلاثي والذي يتحرر في المصل نتيجة الحقن المستمر بدكستران الحديد ويشترك في تفاعلات غير مسيطر عليها (غير منتظمة) إذ أن ايون الحديديك 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 الحُمر التي تدور في مجرى الدم وهذا يتفق مع ما جاء به [22] ، وعليه فأن النقص في إعداد كريات الدم الحُمر يسبب فقداناً للدم ومن ثم تخفيفه وبالتالي تقليل قيم PCV .

من جهة أخرى لاحظ [23] إن الانخفاض في إعداد RBCوHbوPCV 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 كريه الدم الحمراء وكما يعمل على تثبيط إنزيم Glutathione peroxidase المهم في إزالة بيرو كسيد الهيدروجين $H_2O_2$ لذا فان تثبيط هذا الإنزيم يعمل على التقليل من عمر الكريه 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 الساندةparenchymal 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 إعراض السمية عند اخذ ملاحق الحديد فمويا خلال هذه المدة.

وأظهرت النتائج ارتفاعا معنويا عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) في معدل مستويات الحديد في المصل ونسبة إشباع الترانسفرين سعة ارتباط الحديد الكلية في حيوانات التجربة كما موضح في الجداول (4و5و6). وهي نتائج متفقة مع[13-28].

إنّ الزيادة في الحديد الحر قد تعود إلى الجهد التاكسدي 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 لطرحه 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 (الترانسفرين) لأجل التخلص من الحديد الفائض أما الزيادة في نسبة إشباع الترانسفرين فهو التغير الأول الذي يدل على تطور حمل الحديد في الأنسجة حيث ذكر [30], إن مصل الدم في مرضى الثلاسيميا يمكن إن يحتوي حديد غير مرتبط بالترانسفرين وهذا الحديد يمكن إن يستحث أكسدة الدهون Lipid peroxidation ولاحقا استهلاك مضادات الأكسدة.

كما أشارت نتائج الدراسة الحالية أن فيتامين (هـ) قلل من تأثيرات حمل الحديد على أعداد كريات الدم الحمر وحجم مكداس الدم و تركيز 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 الاراكودونيك 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 ارتفاعا معنويا عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) في معدل مستويات الحديد في المصل ونسبة إشباع الترانسفرين %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 [34-35-36] .

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 جرع الفيتامينات لاتستطيع التخفيف من ضرر الحديد.

## المصـــــــادر 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). Hepcidin, 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 syntheses 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 hypercholestolemic 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 الكيموحيوية عند مرضى الثلاسيميا(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 hepatocellularcarcinoma 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.