

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI**

**DEMİR SÜKROZ VE DEMİR DEKSTRAN'IN
SIÇANLARDA PERİFERİK KANDA LENFOSİT
DAĞILIM VE İŞLEVLERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MEHMET SERT

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. CANER ÇAVDAR

İZMİR-2011

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI**

**DEMİR SÜKROZ VE DEMİR DEKSTRAN'IN
SIÇANLARDA PERİFERİK KANDA LENFOSİT
DAĞILIM VE İŞLEVLERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MEHMET SERT

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. CANER ÇAVDAR

**Bu araştırma DEÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2011-66)**

İZMİR-2011

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	4
ŞEKİL LİSTESİ	5
GRAFİK LİSTESİ	6
RESİM LİSTESİ	7
KISALTMALAR	8
TEŞEKKÜR	10
ÖZET	11
İNGİLİZCE ÖZET	13
GİRİŞ VE AMAÇ	15
GENEL BİLGİLER	19
GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
BULGULAR	36
TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	60

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Son dönem böbrek yetmezliğinde doğal immünite bozuklukları

Tablo 2. SDBY'de edinsel immünite bozuklukları

Tablo 3. Demirin nötrofiller üzerine etkisi

Tablo 4. Grupların toplam lenfosit yüzdeleri

Tablo 5. Grupların T lenfosit (CD3⁺) yüzdeleri

Tablo 6. Grupların T helper (CD3⁺/CD4⁺) yüzdeleri

Tablo 7. Grupların T supressor/sitotoksik (CD3⁺/CD8⁺) yüzdeleri

Tablo 8. Grupların T helper/T supressor/sitotoksik (CD4⁺/CD8⁺) oranları

Tablo 9. Grupların aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) yüzdeleri

Tablo 10. Grupların antijen sunan hücre (CD3⁺/RT1B) yüzdeleri

Tablo 11. Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) yüzdeleri

Tablo 12. Grupların natural killer (CD161a⁺) yüzdeleri

Tablo 13. Grupların nötrofil (CD11b⁺) yüzdeleri

Tablo 14. Grupların IFN- γ sonuçları

Tablo 15. Grupların demir, demir bağlama kapasitesi, transferin kapasitesi ve ferritin sonuçları

ŒEKİL LİSTESİ

Œekil 1. KBY hastalarında edinsel bağışıklık sisteminin olası mekanizmaları

Œekil 2. Çalışma Œeması

Œekil 3. Th-1 ve Th-2 tipi cevap

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1.** Grupların toplam lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 2.** Grupların toplam T lenfosit (CD3⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 3.1.** Grupların T helper 0. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 3.2.** Grupların T helper 3. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 3.3.** Grupların T helper 6. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 3.4.** Grupların T helper 24. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 3.5.** Demir dekstran ve demir sükroz gruplarının akım sitometrik T helper (CD3⁺/CD4⁺) sonuçları
- Grafik 4.** Grupların T supressor/sitotoksik (CD3⁺/CD8⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 5.** Grupların T helper/T supressor/sitotoksik (CD4⁺/CD8⁺) oranlarının karşılaştırılması
- Grafik 6.1.** Grupların aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 6.2.** Demir sükroz ve demir dekstran gruplarının akım sitometrik aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) sonuçları
- Grafik 7.1.** Grupların antijen sunan hücre (CD3⁺/RT1B) 0, 3 ve 6. saat yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 7.2.** Grupların antijen sunan hücre (CD3⁺/RT1B) 24. saat yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 7.3.** Demir dekstran ve demir sükroz gruplarının akım sitometrik aktive T lenfosit (CD3⁺/RT1B) 24. saat sonuçları
- Grafik 8.1.** Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) 0, 3 ve 24. saat yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 8.2.** Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) 6. saat yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 9.** Grupların natural killer (CD161a⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 10.** Grupların nötrofil (CD11b⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması
- Grafik 11.** Grupların IFN- γ sonuçlarının karşılaştırılması
- Grafik 12.** Grupların demir ve transferrin satürasyonlarının karşılaştırılması

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Sıçanlardan kan alma işlemi

KISALTMALAR

HD	:hemodiyaliz
SDBY	:son dönem böbrek yetmezliği
ESRD	:end stage renal disease
Th	:T helper (yardımcı T hücreleri)
Ts	:T supressor/sitotoksik (baskılayıcı T hücreleri)
NK	: doğal öldürücü hücreler (natural killer)
K/DOQI	: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
IFN-γ	: interferon gamma
IL	:interlökin
DS	:demir sükroz
DD	:demir dekstran
SF	:serum fizyolojik
TfR	: transferrin/transferrin reseptör
TNF-α	:tumor necrosis factor-alpha
MHC	:major histocompatibility complex
ICAM-1	: inter-cellular adhesion molecule-1
EB	:edinsel bağışıklık
EBS	:edinsel bağışıklık sistemi
DBS	:doğal bağışıklık sistemi
EPO	:eritropoietin
SLE	:sistemik lupus eritematozus
HBV	:hepatit B virüs
TCR	:T hücre algacı
PBMC	: periferik kan mononükleer hücre kültürü
APC	: antijen sunan hücre
LFA	: lenfosit fonksiyon antijeni
PTH	:parathormon
TGF	:transforming growth factor
HCV	:hepatit C virüs
HIV	:human immunodeficiency virus

- CD3:** Periferal ve timosit T lenfositleri üzerinde bulunan T hücre reseptörüyle ilgili CD3 hücre yüzey antijeni ile etkileşmektedir [1, 2]. Genel T hücre belirteçidir.
- CD4:** Timosit, çoğu T helper hücreleri içeren olgun T lenfositler, monositler, makrofajlar ve bazı dendritik hücreler üzerindeki CD4 antijeniyle etkileşmektedir [1, 2].
- CD8:** Çoğu T suppressor/sitotoksik hücreleri içeren olgun T lenfositlerin bir alt grubu ve çoğu timositlerin yüzeyinde bulunan CD8 farklılaşma antijenidir [1, 3].
- CD25:** T lenfoblastlar ile timik ve splenik dendritik hücrelerdeki IL-2 reseptörünün alfa-zinciriyle etkileşmektedir. Aktive T lenfositleri yansıtır [4].
- RT1B:** Sıçan MHC II antijenlerinin değişmeyen bağlaçları ile etkileşmektedir [5]. Antijen sunan hücreleri yansıtır.
- CD45RA:** Sadece B lenfositler üzerinde bulunan CD45'in yüksek molekül ağırlıklı bir formuyla etkileşir [6].
- CD161a:** Bütün doğal öldürücü (NK) hücreler ile T lenfositlerin küçük bir alt grubu üzerinde salınmaktadır [7].
- CD11b:** Nötrofiller ve miyeloid hücre belirteçidir [8].

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimi sürecindeki katkı ve desteklerinden dolayı başta hocamız Sayın Prof. Dr. Taner Çamsarı olmak üzere Prof. Dr. Ali Çelik, Prof. Dr. Caner Çavdar ve Prof. Dr. Aykut Sifil'e teşekkür ederim.

Başta Sayın Prof. Dr. İlkay Şimşek olmak üzere tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine yan dal uzmanlık eğitimim sürecindeki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında emeği geçen Prof. Dr. Caner Çavdar, Prof. Dr. Osman Yılmaz, Dr. Halil Ateş, Yrd. Doç. Dr. Zahide Çavdar, Dr. Mehtap Yüksel Eğrilmez ve Araş. Gör. Aslı Çelik'e teşekkür ederim.

Nefroloji eğitimim süresince benimle birlikte olan asistan ve uzman doktor arkadaşlar, periton diyalizi ve hemodiyaliz hemşireleri, diyaliz ve poliklinik sekreterleri, diyaliz ve poliklinik personeli ile birlikte çalışmaktan mutluluk duydum.

Sevgileriyle bana güç veren aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Mehmet SERT

ÖZET

DEMİR SÜKROZ VE DEMİR DEKSTRAN'IN SIÇANLARDA PERİFERİK KANDA LENFOSİT DAĞILIM VE İŞLEVLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Mehmet Sert

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları A.D. Nefroloji B.D

Yazışma Adresi: DEUTF İç Hastalıkları A.D Nefroloji B.D Balçova/ İZMİR

Elektronik posta: mehmet.sert@deu.edu.tr

Giriş: Son dönem böbrek yetmezliğinde (SDBY) immün sistem bozuklukları geliştiği ve bunun sonucunda enfeksiyonlara yatkınlığın arttığı bilinmektedir. Hemodiyaliz (HD) hastalarındaki ölümlerin yaklaşık %16'sı enfeksiyonlara bağlı gelişir ve kalp damar hastalıklarından sonra en sık ikinci ölüm nedenidir. SDBY'li hastalarda aneminin tedavisinde sıkça kullanılan demirin enfeksiyona yatkınlığı arttıran nedenlerden biri olduğu bildirilmektedir. 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 ve makrofaj işlevi neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca demir kullanımı yardımcı T lenfositlerin (CD4⁺) sayısını azaltarak, baskılayıcı T lenfositlerin (CD8⁺) sayısını arttırarak ve yardımcı T lenfosit 1 yolağını baskılayarak hücrel immüniteyi zayıflatmaktadır. Ancak literatürde sık olarak kullanılan demir sükroz ve demir dekstran gibi demir preparatlarının lenfosit dağılımına olan etkilerini karşılaştıran bir çalışma yoktur.

Amaç: Demir sükroz ve demir dekstran'ın sıçanlarda periferik kanda lenfosit dağılımı ve işlevleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 18 Wistar albino sıçan alındı. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı: Grup 1: serum fizyolojik grubu (SF), Grup 2: demir sükroz grubu (DS), Grup 3: demir dekstran grubu (DD). Tüm gruplardan çalışma öncesi periferik kan örnekleri alındı. 0.saatte SF grubuna serum fizyolojik 1 ml/kg, DS grubuna demir sükroz 10 mg/kg ve DD grubuna demir dekstran 10 mg/kg intravenöz yolla verildikten sonra 3, 6 ve 24. saatlerde yeniden periferik kan örnekleri alındı.

Bulgular: DS uygulanan grupta DD ve SF verilen gruplarla karşılaştırıldığında T helper lenfositlerin yüzdesinde 3, 6 ve 24. saatte anlamlı bir düşme saptandı. T sitotoksik lenfosit yüzdesinde 6 ve 24. saatte DS grubunda SF grubuna göre anlamlı artış saptandı. DS grubu ile DD grubu arasında T sitotoksik lenfosit yüzdesi açısından farklılık saptanmadı. CD4/CD8 oranında yine DS grubunda 3, 6 ve 24. saatte SF ve DD grubuna göre anlamlı düşme saptandı. DS grubu içinde aktive T lenfosit yüzdesi (CD3⁺/CD25⁺) 3, 6 ve 24. saatlerde; DD grubu içinde ise 6. ve 24. saatlerde anlamlı düşme saptandı. DS grubu ile SF grubu karşılaştırıldığında aktive T lenfosit yüzdesi (CD3⁺/CD25⁺) 3, 6 ve 24. Saatlerde; DD grubu ile karşılaştırıldığında ise 24. saatte anlamlı şekilde düşük bulundu. DS grubunda antijen sunan hücre yüzdesi SF grubuna göre 6 ve 24. saatlerde DD grubuna göre de 24. saatte anlamlı olarak düşük bulundu. DS grubunda B lenfosit yüzdesinin 6. saatte DD ve SF grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü. DS grubunda 3. saatte IFN- γ seviyesinde DD ve SF gruplarına göre anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir. DS grubunda DD ve SF grubuna göre daha yüksek demir ve transferrin saturasyonu saptanmıştır.

Sonuç: Sağlıklı sıçanlarda yapılan bu çalışma sonucunda demir sükrozun demir dekstrana göre yardımcı T lenfositleri, aktive T lenfositleri, antijen sunan hücreleri, B lenfositleri ve interferon gamayı azaltarak; baskılayıcı T lenfositleri arttırarak lenfosit dağılımını olumsuz etkilediği saptanmıştır.

Bu bulgular ışığında demir sükrozun demir dekstranla karşılaştırıldığında periferik kanda lenfosit dağılımı ve işlevleri üzerine daha fazla olumsuz etkilerinin olduğu sonucu çıkarılabilir.

Anahtar kelimeler: demir sükroz, demir dekstran, lenfosit dağılımı, immünite

ABSTRACT

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

Introduction: It is well-known that end stage renal failure (ESRD) is associated with immunocompromisation that leads to increased tendency to infections. Infections is the second leading cause of mortality (16%) in hemodialysis patients after cardiovascular diseases. It has been reported that iron frequently used in the treatment of anemia in ESRD patients is one of the reasons that increase tendency to infections. There are studies that reveal the negative effects of iron on both innate and acquired immune systems. In the studies it was shown that iron load caused impairment of neutrophilic chemotaxis, phagocytosis, and intracellular killing capacity, and leads to dysfunction of macrophages. Also iron use attenuates cellular immunity by decreasing the number of T helper lymphocytes (CD4+), increasing T suppressor lymphocytes (CD8+), and suppressing the pathway of T helper 1 lymphocytes. Yet there is no evidence about comparison of effects of different iron preparations as well as iron sucrose and iron dextran which frequently used in clinic on the distribution of lymphocytes in the literature

Background: The comparison of effects of iron sucrose and iron dextran on the distribution and function of peripheral lymphocytes in rats.

Material and method: The study included 18 Wistar albino rats. Rats were divided into three groups; group 1: control group (saline group, SF), group 2: iron sucrose group (DS), and group 3: iron dextrane group (DD). Peripheral blood samples were drawn from all groups before study. SF group was given normal saline as 1 ml/kg, DS group was given iron sucrose in dosage of 10 mg/kg, and DD group received iron dextrane as 10 mg/kg intravenously at hour 0, and then blood samples were drawn again at hours 3, 6, and 24.

Results: In comparison with SF and DD groups, DS group revealed significant decrease in the percentage of T helper lymphocytes at 3, 6, and 24 hours. The percentage of T suppressor lymphocytes in DS group showed significant increase at 6 and 24 hours when compared to SF group. There was no difference between DS group and DD group in terms of percentage of T suppressor lymphocytes. The ratio of CD4 to CD8 in DS group was significantly low compared to both SF and DD

groups in all hours. Activated T lymphocyte(CD3+/CD25+) percentage was significantly decreased in DS group at 3,6, and 24 hours against SF and DD groups. The percentage of antigen presentig cells (RT1B) in DD group was higher than that of DS group at 24-hour. In comparison with DS and SF groups, DS group revealed significant decrease in the percentage of antigen presenting cells at 6 and 24 hours. B lymphocyte percentage at 6-hour, and the level of IFN- γ at 3-hour in DS group were significantly low compared to other groups. We detected higher iron and transferrin saturation levels in DS group than others.

Conclusion: In this study conducted in healty rats, iron sucrose, compared to iron dextran, had a negative effect on distribution of lymphocytes by decreasing T helper and activated T cells, antigen presenting cells and B lymphocytes, and increasing T suppressor cells. Studies are needed to do in those with renal failure.

Key words: iron sucrose, iron dextran, distribution of lymphocytes, immunity

Demir Sükröz ve Demir Dekstran'ın Sıçanlarda Periferik Kanda Lenfosit Dağılım ve İşlevleri Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması

Giriş ve Amaç: Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) bulunan hastalarda ölüm riski normal topluma göre 100-300 kat daha fazladır. Hemodiyaliz (HD) hastaları arasında en sık ölüm nedeni kalp damar hastalıkları ve enfeksiyonlardır. HD hastalarında yıllık ölüm oranı %10,6-20'dir [9]. HD hastalarında immün sistemde yer alan hücrelerin işlevlerinde ve hücreler arası etkileşimde bozukluk tanımlanmıştır.

HD hastalarında yapılan çalışmalarda nötrofillerin kemotaksi, fagositoz ve bakterisidal aktiviteleri azaldığı gösterilmiştir [10-12].

Protein yapısında antijen içeren aşılara antikor cevabı için gerekli olan T lenfosit işlevinin HD hastalarında bozukluğu özellikle hepatit B virüs (HBV) aşılmasına yanıtın [13-19] neden olmaktadır.

HD hastalarında T lenfositler ve makrofajlar arasındaki etkileşim bozulmuştur ve bunun sonucunda HD hastalarında aktif tüberküloz riski 7-25 kat artmış bulunmuştur [20-23]. Ayrıca HD hastalarında tüberkülin cilt testi (PPD) yanıtı da azalmıştır [24].

HD hastalarında uyarılmış T lenfosit çoğalması azalmıştır. Sadece T hücre algaç (TCR) aracılı uyarılma ile salınan interlökin 2 (IL-2) ve interferon gammanın IFN- γ mRNA düzeyleri azalmıştır. T lenfosit aktivasyonunda antijen sunan hücre (APC) bağımlı uyarıda azalma olduğu gösterilmiştir [25]. Bu APC işlev bozukluğu T lenfositlere antijen sunumundan veya reseptör sinyalinde azalmadan kaynaklanabilir. Üremik ortamda CD4 T lenfositlerin TCR yoğunluğunun %40 azalttığı gösterilmiştir [26-28]. T lenfositlerle APC veya hedef hücre arasındaki ilk etkileşimde önemli rol oynarlar adezyon moleküllerinden monositlerin yüzeyindeki interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) azalmış iken lenfosit fonksiyon antijeni-1 (LFA-1) yoğunluğu artmıştır [26]. T lenfosit aktivasyonunun gerçekleşmesi için iki uyarı gereklidir. Birinci uyarı; antijen özgün (TCR ile MHC kompleksi arasındaki etkileşimi gerektirir) ikinci uyarı; reseptör etkileşimi (APC'lerin yüzeyinde yer alan CD80/CD86 ile T lenfositlerin yüzeyinde yer alan CD28 arasındaki etkileşimi gerektirir) ile oluşur. İkinci uyarı eksikliğinde T lenfositler anerjik olur veya apoptozise gider [29]. HD hastalarından alınan T lenfosit kültürüne sağlıklı bireylerden alınan monositler eklendiğinde T lenfosit çoğalmasının düzeldiği gözlenmiştir [30]. HD hastalarında akım sitometri çalışmaları ile monosit CD86 salınımının azaldığı gösterilmiştir.

CD4 Th'lerin (Th0) aktivasyonunu Th1 veya Th2 lenfositlerin farklılaşması izler. Th1 lenfositler IFN- γ sentezleyerek CD8 T lenfositleri ve makrofajları aktif hale getirerek edinsel bağışıklık sistemi (EBS)'nin selüler kolunu baskın hale getirir. Th2 lenfositler esas olarak IL-4 sentezleyerek B lenfositleri aktif hale getirerek EBS'nin humoral kolunu aktif hale getirirler [31]. HD hastalarında IL-2 üretiminin düşmesi hem Th1 hem de Th2 farklılaşmasını azaltarak her iki kolu da baskılar [32, 33].

Anemi son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) bulunan hastalarda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir [34]. SDBY'li hastalarda aneminin en sık nedeni demir ve eritropoietin eksikliğidir. SDBY'li hastalarda demir eksikliği birçok nedene bağlı gelişebilir ve intravenöz demir kullanımı bu hastalarda aneminin tedavisi için tercih edilen yoldur. Ancak demir kullanımının HD hastalarında enfeksiyona yatkınlık yaratan nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Demir 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 (antijen sunumunda azalma, algaç sayısında azalma) neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca demir kullanımı T helper lenfositlerin (CD4⁺) sayısını azaltarak, T supressor lenfositlerin (CD8⁺) sayısını arttırarak ve T helper 1 yolağını baskılayarak hücrel immüniteyi zayıflatmaktadır.

Th alt gruplarının da demire cevabı farklılık göstermektedir. Th lenfositlerinin iyi bilinen üç alt grubu vardır ve her biri farklı, kendine özgü sitokin sentezleyerek farklı immün işlevler görürler. Th-1 lenfositler, IFN- γ ve TNF- β gibi sitokinler salgılar ve makrofajları aktive ederek TNF- α , IL-1 veya IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumuna katkıda bulunurlar. Th-1 lenfositler ayrıca sitotoksik T lenfositleri aktive ederler. Th-2 lenfositler IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi sitokinler sentezleyerek makrofaj işlevlerini baskılar ve antiinflamatuvar etki oluştururlar. Th-2 lenfositler ayrıca alerjik reaksiyonlara katılan hücreleri aktive ederler. Th-3 lenfositler IL-10 ve TGF- β gibi sitokinler sentezleyerek tüm immün cevabı baskırlarlar [35]. Th-1 lenfositler demir yüklemesine en duyarlı olanlardır (97).Demir ek olarak; Th-1/Th-2 dengesini de etkilemektedir. Demir, Th-1 yanıtını zayıflatır ve Th-2 yanıtını arttırır. Bu; enfeksiyon ve tümör olgularında istenmeyen bir durumdur [36, 37]. Sıçanlarda in vitro demir sitrat yüklemesi sonrasında CD4 ve CD2 lenfositlerde azalma, toplam lenfosit

sayısının değişmediği ve CD4/CD8 oranında azalma gösterilmiştir. CD4 lenfositlerdeki azalmanın en fazla 12. saatte olduğu 48. saatte ise eski düzeyine geldiği tespit edilmiştir [38]. Sıçanlarda üç hafta süre ile günlük 1,5 mg/kg demir dekstran'ın intramusküler uygulandığı bir çalışma sonucunda lenfosit çoğalmasında azalma olduğu gösterilmiştir [39].

Demir yüklemesinin demir dekstran ile yapıldığı çalışmalarda makrofajların *Legionella*, *Ehrlichia*, *Candida* ve virüsler gibi hücre içi patojenleri öldürme yeteneklerini kaybettikleri in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir [40, 41]. Bunun nedeni demir fazlalığında makrofajların enfeksiyon etkenleri ve tümör hücreleri ile mücadelesi için gerekli olan efektör bir molekül olan nitrik oksit oluşumunun azalmasıdır. Demir ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentazın transkripsiyonunu bloke etmektedir [42, 43].

Yedi hafta süreyle ağız yoluyla demir yüklemesi (3000 veya 5000 mg/kg/gün) yapılan farelerde INF- γ düzeyinde düşme ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonunda belirgin azalma gözlenmiştir. Demir yüklemesi yapılan fareler düşük demir içeren diyete (7 mg/kg/gün) geçtiklerinde ise INF- γ düzeyinde artma ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonunda düzelme gözlenmiştir [44].

Hemokromatozisli hastalarda makrofajlarda IFN- γ aracılı yolların baskılanarak; proinflatuvar sitokin olan TNF- α salınımında, MHC II antijenlerinin ve ICAM-1'in ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir [45-47]. Hemokromatozisli hastalarda yapılan çalışmalarda CD4 T lenfositlerin azaldığı, CD8 lenfositlerin arttığı, immunglobulin sentezinin azaldığı ve CD4/CD8 oranının azaldığı bildirilmiştir [48].

Demir yüklemenin immünite üzerindeki olumsuz etkisi serbest demir ile açıklanmaktadır. Dünyada kullanımda olan intravenöz demir preparatları demir-oksihidroksit jel içeren bir çekirdek ve bu çekirdeği kaplayan ve molekülün stabilizeşmesine yarayan karbohidrat bir kılıftan oluşmaktadır. Bu kılıf biyoaktif demirin yavaş salınarak hastalar tarafından kolay tolere edilebilmesini sağlar. Demir preparatları arasındaki temel farklılık 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 [49]. Türkiye'de intravenöz kullanım için uygun olan iki demir preparatı demir sükroz ve düşük molekül ağırlıklı demir dekstrandır. Demir dekstran

demir sü kroza göre daha büyük çekirdeğe ve kılıfa sahiptir. Demir dekstran demir sü kroza göre serbest demir oluşturması daha az, transferini doyurma zamanı ve plazma yarı ömrü daha uzundur. Bunun sonucunda hücre sel düzeyde daha az olumsuz etkisi olması beklenmektedir.

Hemodiyaliz hastalarında yürütölen bir çalışmada tek doz demir sü krozun (30 ve 100 mg) lökosit yüzey antijenlerine (CD11b, CD14, CD36 ve CD45) etkisinin olmadığı bildirilmiştir [50].

Hemodiyaliz hastalarında elde edilen hücrelerin kültüründe demir glukonat, demir sü kroz ve demir dekstran'ın (25, 50 ve 100 µg/mL) lenfosit dağılımına (CD4, CD16, CD40 ve CD56) etkisini inceleyen bir çalışmada CD4 ve CD16 pozitif hücrelerde azalma görölmüştür. Aynı çalışmada demir sü kroz ve demir glukonatin demir dekstran ile karşılaştırıldığında CD4 ve CD16 pozitif hücreleri daha fazla azalttığı bildirilmiştir [51].

Demir preparatlarını lenfosit dağılımına etkisini karşılaştıran literatürde sadece bir çalışma vardır. Bu çalışma hücre kültürü çalışması olup sadece T helper lenfositler, T sitotoksik lenfositler ve natural killer hücreleri çalışılmıştır. Son dönem böbrek yetmezliği bulunanlarda veya sağlıklı bireylerde bağışıklık sistemindeki tüm yolları değerlendiren ve farklı demir preparatlarının ayrıntılı bir şekilde karşılaştırıldığı bir çalışma yoktur.

Önceki bulgulardan ortaya çıkarak demir dekstran'ın demir sü kroza göre lenfosit dağılımı ve işlevi konusunda daha az olumsuz etkiye sahip olabileceği hipotezi ortaya konulabilir.

Amaç: Demir sü kroz ve demir dekstran'ın sıçanlarda periferik kanda lenfosit dağılım ve işlevleri üzerine olan etkilerini karşılaştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Son dönem böbrek yetmezliğinde immün sistem bozuklukları geliştiği ve bunun sonucunda enfeksiyonlara yatkınlığın arttığı bilinmektedir. HD hastalarındaki ölümlerin yaklaşık %16'sı enfeksiyonlara bağlı gelişir ve kalp damar hastalıklarından sonra en sık ikinci ölüm nedenidir [52]. Hemodiyaliz (HD) hastalarında sepsise bağlı ölüm 100–300 kat daha fazladır [53].

Kronik Böbrek Yetmezliğinde Bağışıklık Sistemi

SDBY bulunan hastalarda doğal bağışıklık sisteminde (DBS) tanımlanmış olan bozukluklar Tablo 1'de; edinsel bağışıklık sistemindeki (EBS) bozukluklar ise Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 1. Son dönem böbrek yetmezliğinde doğal bağışıklık bozuklukları

Doğal Bağışıklık	SDBY'de gelişen bozukluk	Kaynak
Antijen tanıma		
Sekresyon	Artmış	[54, 55]
Endositoz	Azalmış	[56-58]
Uyarı iletimi	Azalmış	[59, 60]
Monositler	Aktive	[61]
Nötrofiller	Bakteri öldürme kapasitesinde azalma	[62]
Sitokinler	Artmış (azalmış renal klirens, üretimin artması)	[63, 64]
Kompleman	Aktive olmuş	[65]

Tablo 2. SDBY'de edinsel immünite bozuklukları

Edinsel Bağışıklık	SDBY'de gelişen bozukluklar	Kaynak
T lenfositler	Bozulmuş aktivasyon Artmış Th1/Th2 oranı	[66, 67]
B lenfositler	Azalmış sayı-korunmuş işlev	[68]
Antijen sunan hücreler	Aktive ancak işlevleri bozuk	[68]

SDBY'li hastalarda makrofajlar süregen olarak uyarılır ve bunun sonucunda yangısal sitokinlerin artışı gerçekleşir [58]. HD hastalarında sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında nötrofillerin bakteri öldürme kapasitesinde azalma saptanmıştır. Bundan diyalizle uzaklaştırılabilen üremik solütler sorumlu tutulmuştur. İn vitro, üremik serumun diyalizi ile nötrofillerin öldürme kapasitesinde artış gözlenmiştir [62]. SDBY bulunan hastalarda mannoz-bağlayan lektin düzeylerinde yükseklik

saptanmıştır. Bunun SDBY'li hastalarda enfeksiyona yatkınlığı ve mortaliteyi arttırdığı belirtilmektedir [55]

HD hastalarında aşılama sonrasında koruyuculuk düzeyinde antikor oluşumu %50–70 iken genel toplumda %90'nın üzerindedir [13-16]. HD hastalarında *Influenza virüs* [17], *C. tetani* [18] ve *C. diphtheria* [19] aşılması sonrasında yüksek başarısızlık oranı gözlenmiştir. Bu aşuların tümünde kullanılan antijenler protein yapısındadır ve antikor cevabı oluşturmak için T lenfosit işlevlerine bağımlıdır [69, 70]. Tam tersi polisakkarit yapıda antijen içeren pnömokok aşısına yanıt HD hastalarında normaldir [71, 72]. Polisakkarit yapısındaki antijenlere cevap T lenfosit işlevlerinden bağımsızdır [69]. Sonuç olarak HD hastalarında EBS bozukluğu esas olarak T lenfositlerdedir. HD hastalarında immunglobulin düzeyleri normaldir [73].

T lenfositler ve makrofajlar arasındaki etkileşim *M. tuberculosis* enfeksiyonlarına yanıtta çok önemlidir [74]. Birçok çalışmada HD hastalarında aktif tüberküloz riski 7–25 kat artmış bulunmuştur [20-23]. Ayrıca HD hastalarında tüberkülin cilt testi (PPD) yanıtı azalmıştır [24]. *Candida albicans* türevi protein içeren cilt testine yanıt da HD hastalarında bozulmuştur.

HD hastalarında lökosit sayısı genellikle normaldir. Hafif bir monositoz ve lenfopeni vardır. Ancak lenfopeninin derecesi EB'deki yetersizliği açıklayacak düzeyde değildir. Lenfosit sayısı nadiren normal sınırların altına düşer ve CD4/CD8 oranı genellikle normaldir [75].

Hücre kültürü çalışmalarında anti-CD3 monoklonal antikorlar gibi çeşitli mitojenlerle uyarılmış T lenfosit çoğalmasının azaldığı gösterilmiştir [25, 26]. Ayrıca sadece T hücre algaç (TCR) aracılı uyarılma ile salınan interlökin 2 (IL-2) ve interferon gammanın (IFN- γ) mRNA düzeyleri azalmıştır. HD hastaların periferik kan mononükleer hücre kültüründe (PBMC) IL-2 salınımında azalma [33].

T lenfosit aktivasyonunda antijen sunan hücre (APC) bağımlı uyarıda azalma olur [25]. Bu APC işlev bozukluğu T lenfositlere antijen sunumundan veya reseptör sinyalinde azalmadan kaynaklanabilir. Çoğu önemli çalışma APC yüzeyinde yer alan MHC ile T lenfositleri yüzeyinde yer alan TCR arasındaki etkileşime odaklanmıştır. Üremik serumun sağlıklı kişilerden alınan CD4 T lenfosit kültürüne eklendiğinde CD4 T lenfositlerin TCR yoğunluğunu %40 azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak; HD hastalarından izole edilen monositlerin bazalde MHC II salınımının değişmediği ancak uyarı ile salınımın bozulduğu gösterilmiştir. HD hastalarında HBV aşılmasına yanıtın TCR yoğunluğu ile doğrudan ilişkili olması bu deneysel verinin klinik

sonucudur [26-28]. Bu sonuçlarla HD hastalarında bozulmuş EBS; CD4 T lenfositlerin yüzeyinde azalmış TCR yoğunluğuna ve monositlerin yüzeyinde azalmış MHC II molekül yoğunluğuna bağlı olabilir.

HD hastalarında immünite bozukluğunu destekleyen diğer bulgu monositlerin yüzeyindeki interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) azalmış iken lenfosit fonksiyon antijeni-1 (LFA-1) yoğunluğu artmıştır [26]. Adezyon molekülleri T lenfositlerle APC veya hedef hücre arasındaki ilk etkileşimde önemli rol oynarlar [76]. Bu etkileşim ile ilk T lenfosit aktivasyonunu immün sinaps oluşumu izler. İmmün sinaps MHC kompleksi, TCR, CD80/86 ve CD28'in merkezde; LFA-1 ve ICAM-1'in periferde yer aldığı bir oluşumdur. İmmün sinaps T lenfosit yanıtının süresi ve yoğunluğunu belirler [77, 78]. Sonuç olarak adezyon moleküllerindeki bozukluk HD hastalarında EBS'yi etkilemektedir.

HD hastalarında bozulmuş EBS'nin bozulmasına katkıda bulunan diğer etken bozulmuş reseptör işlevidir. T lenfosit aktivasyonunun gerçekleşmesi için iki uyarı gereklidir. Birinci uyarı antijen özgün (TCR ile MHC kompleksi arasındaki etkileşimi gerektirir), ikinci uyarı reseptör etkileşimi (APC'lerin yüzeyinde yer alan CD80/CD86 ile T lenfositlerin yüzeyinde yer alan CD28 arasındaki etkileşimi gerektirir) ile oluşur. İkinci uyarı eksikliğinde T lenfositler anerjik olur veya apoptozise gider [29]. HD hastalarından alınan T lenfosit kültürüne sağlıklı bireylerden alınan monositler eklendiğinde T lenfosit çoğalmasının düzeldiği gözlenmiştir [30]. HD hastalarında akım sitometri çalışmaları ile monosit CD86 salınımının azaldığı gösterilmiştir.

Farklılaşmamış CD4 Th'lerin (Th0) aktivasyonunu Th1 veya Th2 lenfositlerin farklılaşması izler. Th1 lenfositler IFN- γ sentezleyerek CD8 T lenfositleri ve makrofajları aktif hale getirerek EBS'nin selüler kolunu baskın hale getirir. Th2 lenfositler esas olarak IL-4 sentezleyerek B lenfositleri aktif hale getirerek EBS'nin humoral kolunu aktif hale getirirler [31]. HD hastalarında IL-2 üretiminin düşmesi hem Th1 hem de Th2 farklılaşmasını azaltarak her iki kolu da baskılar [32, 33]. Akım sitometri çalışmaları HD hastalarında Th1 farklılaşmasının daha baskın olduğunu ortaya koymuştur [79]. Th2 farklılaşmasını baskılanması HD hastalarında B lenfosit işlevlerinin bozulmasına ve protein yapıdaki antijenlere karşı antikor yanıtının azalmasına neden olur.

Klinik olarak HD hastalarında protein antijenleri içeren aşılamalara antikor yanıtının yetersiz olması ve SLE hastalarında HD'ye başladıktan sonra klinik iyileşmenin gözlenmesi HD hastalarında T lenfositlerin Th2'ye farklılaşmasının

bozukluğunu yansıtmaktadır. SLE hastalarında HD öncesi Th2 lenfositlerin arttığı gözlenirken HD'ye başladıktan sonra Th1/Th2 oranı normale gelmektedir [80]. Sester ve ark. HD hastalarında IL-12 üretiminin arttığını göstermişlerdir [79]. IL-12; CD4 lenfositlere etki ederek IFN- γ üretimini artırır ve IL-4 üretimini azaltır [81, 82].

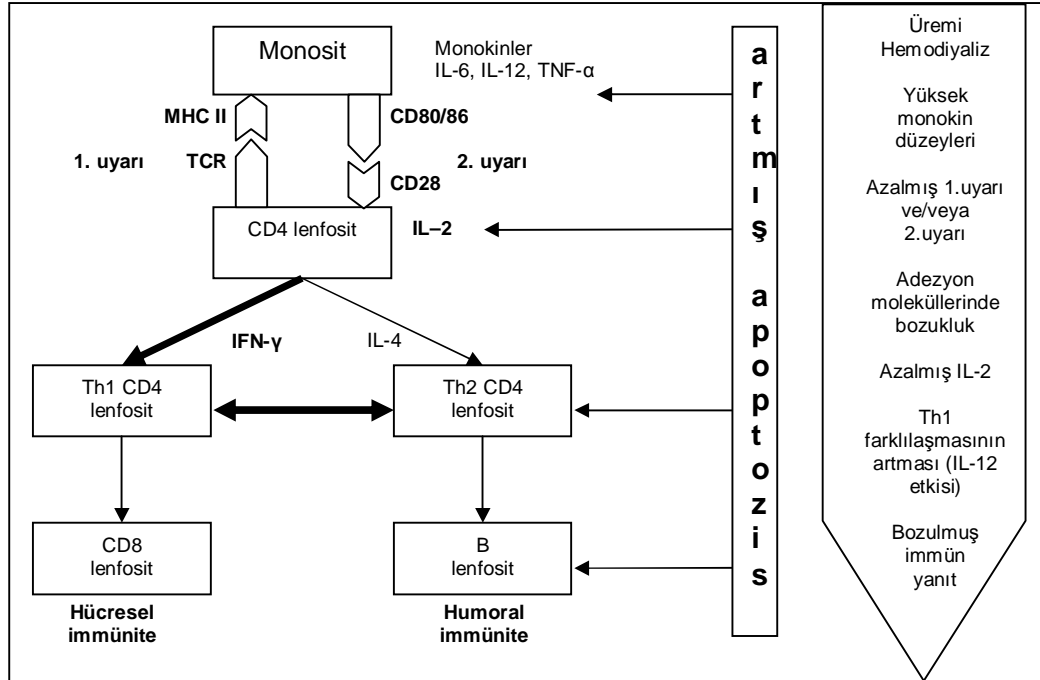
HD hastalarında monositler aktive durumdadırlar ve IL-1 β , IL-6, IL-12 ve tümör nekrosis faktör (TNF- α) salınımı artmıştır ancak lipopolisakkarit yapıdaki uyarılara yanıt azalmıştır [83, 84]. Monosit aktivasyonu hücre kültüründe lenfosit apoptozisini arttırmaktadır [85].

HD hastalarında IL-10 düzeyinin arttığını bildiren çalışmalar vardır [86]. IL-10 monositlerden sentezlenir. IL-10 düzeyinin artması MHC II salınımını azaltarak immün cevabı baskırlar [87].

HD hastalarında bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olan etmenlerden biri de artmış aktive T lenfosit ve B lenfosit apoptozisidir [88].

Şekil 1'de kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarında edinsel bağışıklık sistemindeki bozuklukların olası mekanizmaları sunulmuştur [89].

Şekil 1. KBY hastalarında EBS bozukluklarının olası mekanizmaları



Demir ve Bağışıklık Sistemi

Anemi son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) bulunan hastalarda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir [34]. SDBY'li hastalarda aneminin en sık nedeni demir eksikliğidir. SDBY'li hastalarda demir eksikliği birçok nedene bağlı gelişebilir ve intravenöz demir kullanımı bu hastalarda aneminin tedavisi için tercih edilen yoldur. Ancak demir kullanımının HD hastalarında enfeksiyona yatkınlık yaratan nedenlerden biri olduğu düşünölmektedir [52].

Demir diğer tüm çoğalan hücrelerde olduğu gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğalması ve işlev görmesinde ana düzenleyici moleküllerden biridir. Lenfositler özgün immünitenin esas hücreleridir. Bu hücrelerin çoğalması ve farklılaşması normal immün işlev için hayati önem taşır [90, 91]. Tüm T lenfositler, B lenfositler, doğal öldürücü hücreler (NK) demiri transferrin/transferrin reseptör (TfR) yolu ile alırlar ve yolağın anti-TfR ile bloke edilmesi bu hücrelerde çoğalmanın ve farklılaşmanın bozulmasına neden olur. Lenfosit alt grupları arasında transferrin aracılı demir alımı açısından farklılıklar vardır. Th alt gruplarının da demire cevabı farklılık göstermektedir. Th lenfositlerinin iyi bilinen üç alt grubu vardır ve her biri farklı, kendine özgü sitokin sentezleyerek farklı immün işlevler görürler. Th-1 lenfositler, IFN-γ ve TNF-β gibi sitokinler salgılar ve makrofajları aktive ederek TNF-α, IL-1 veya IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumuna katkıda bulunurlar. Th-1 lenfositler ayrıca sistotoksik T lenfositleri aktive ederler. Th-2 lenfositler IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi sitokinler sentezleyerek makrofaj işlevlerini baskılar ve antiinflamatuvar etki oluştururlar. Th-2 lenfositler ayrıca alerjik reaksiyonlara katılan hücreleri aktive ederler. Th-3 lenfositler IL-10 ve TGF-β gibi sitokinler sentezleyerek tüm immün cevabı baskırlar [35]. Th-1 lenfositler demir yüklemesine en duyarlı olanlardır (97). Anti-TfR antikörların verilmesi sonrası Th-1 lenfositlerin DNA sentezi baskılanırken Th-2 lenfositler etkilenmemektedir. Th-2 lenfositlerin hücre içi demir miktarı Th-1 lenfositlere göre daha fazladır. Bundan dolayı Th-1 aracılı immün efektör yolaklar in vivo demir homeostazındaki değişikliklere daha duyarlıdırlar [45]. Sıçanlarda in vitro demir sitrat yüklemesi sonrasında CD4 ve CD2 lenfositlerde azalma, toplam lenfosit sayısının değişmediği ve CD4/CD8 oranının azaldığı gösterilmiştir. CD4 lenfositlerdeki azalmanın en fazla 12. saatte olduğu 48. saatte ise eski düzeyine geldiği tespit edilmiştir [38]. Sıçanlarda üç hafta süre günlük 1,5 mg/kg demir dekstranın intamusküler uygulandığı bir çalışma sonucunda lenfosit çoğalmasında azalma olduğu gösterilmiştir [39].

Hemokromatozisli hastalarda makrofajlarda IFN- γ aracılı yolların baskılanarak; proinflamatuvar sitokin olan TNF- α salınımında, MHC II antijenlerinin ve ICAM-1'in ekspresyonunda, neopterin (in vivo ve in vitro hücrel immünitenin aktivasyon belirteci olarak kullanılan molekül) oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir [45-47]. Hemokromatozisli hastalarda yapılan çalışmalarda CD4 T lenfositlerin azaldığı, CD8 lenfositlerin arttığı, immunglobulin sentezinin azaldığı ve CD4/CD8 oranının azaldığı bildirilmiştir [48].

Demir yüklemesinin demir dekstran ile yapıldığı çalışmalarda makrofajların *Legionella*, *Ehrlichia*, *Candida* ve virüsler gibi hücre içi patojenleri öldürme yeteneklerini kaybettikleri in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir [40, 41]. Bunun nedeni demir fazlalığında makrofajların enfeksiyon etkenleri ve tümör hücreleri ile mücadelesi için gerekli olan efektör bir molekül olan nitrik oksit oluşumunun azalmasıdır. Demir ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentazın transkripsiyonunu bloke etmektedir [42, 43].

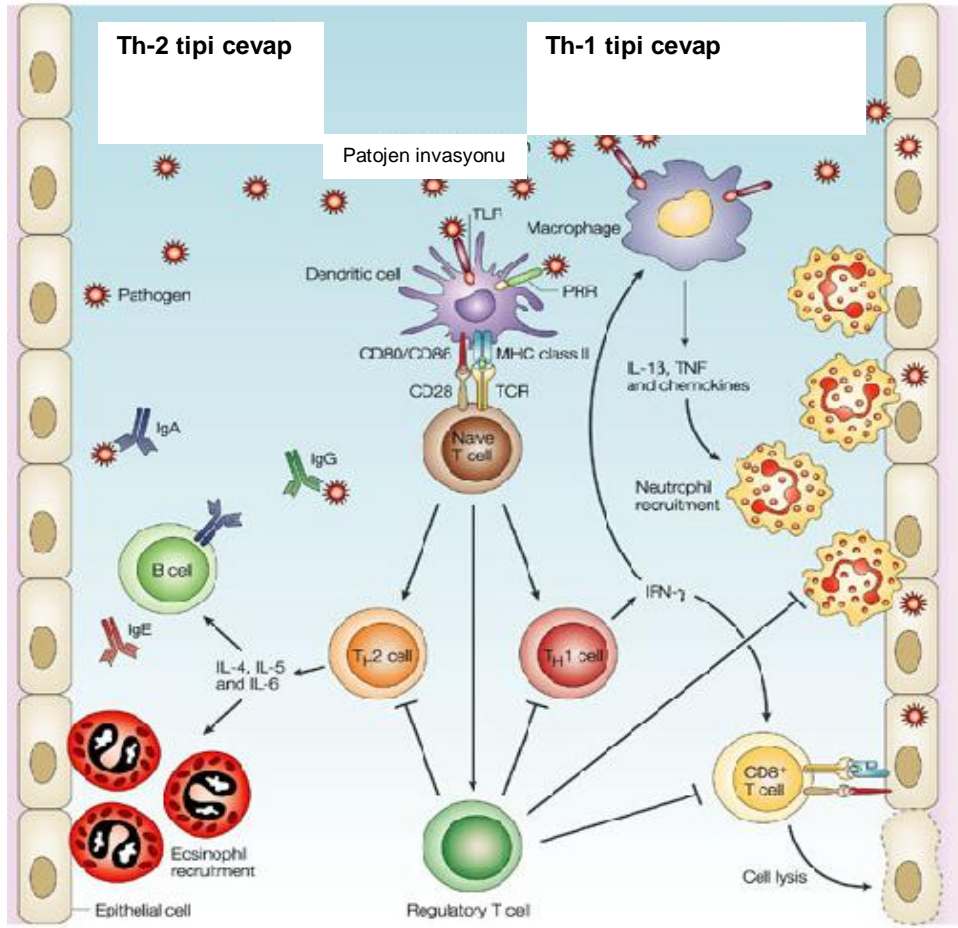
Yedi hafta süreyle ağız yoluyla demir yüklemesi (3000 veya 5000 mg/kd/gün) yapılan farelerde INF- γ düzeyinde düşme ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonunda belirgin azalma gözlenmiştir. Demir yüklemesi yapılan fareler düşük demir içeren diyetle (7 mg/kg/gün) geçtiklerinde ise INF- γ düzeyinde artma ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonunda düzelleme gözlenmiştir [44].

Dünya genelinde sağlık sorunu olan hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu, human immun deficiency virus (HIV) enfeksiyonu ve tüberküloz hastalığının seyri ile demir kullanımı arasında ilişki tanımlanmıştır. HCV enfeksiyonunda karaciğerde biriken demir toksik radikallerle doku hasarını arttırarak ve Th-1 yanıtının azaltarak doku hasarını arttırmaktadır. Ek olarak demir HCV'nin çoğalmasını başlatıcı faktör (eIF-3) ekspresyonu da arttırmaktadır [92]. Sonuç olarak demir HCV enfeksiyonunun seyri hızlandırmaktadır.

Afrika'da endemik olarak ikincil demir yüklenmesinin olduğu bölgelerde tüberküloz sıklığı ve tüberkülozdan ölüm oranı artmaktadır [93]. HIV enfeksiyonunda diyetle alınan demirin arttırılması veya kemik iliğinde demir depolarının artması kötü klinik seyirle ilişkili bulunmuştur [94].

Demir ek olarak; Th-1/Th-2 dengesini de etkilemektedir. Demir, Th-1 yanıtını zayıflatır ve Th-2 yanıtını arttırır. Bu; enfeksiyon ve tümör olgularında istenmeyen bir durumdur [36, 37]. Şekil 3'te Th-1 ve Th-2 tipi cevap şematize edilmiştir.

Şekil 3. Th-1/Th-2 tipi cevap



Demir fazlalığı nötrofil fonksiyonlarını da olumsuz etkilemektedir. Her diyaliz seansında 10-20 mg demir sükröz tedavisi alan HD hastalarında nötrofillerin fagositoz kapasitesini ve bakteri öldürme yeteneğini olumsuz etkilemektedir [95]. Sağlıklı bireylerde ve hemodiyaliz hastalarında hücre kültüründe nötrofil işlevlerini ve buna demir dekstran'ın etkisini inceleyen bir çalışmada hemodiyaliz hastalarında başlangıçta kontrollere göre nötrofil işlevlerinde azalma tespit edilmiştir. HD hastalarına demir dekstran uygulanması hidrojen peroksit üretimine olumsuz etkisi olmamıştır. Her iki grupta da yüksek doz demir dekstrandan sonra fagositoz kapasitesinde azalma saptamıştır [96].

Tablo 3'de demirin nötrofiller üzerindeki etkisi özetlenmiştir.

Tablo 3. Demirin nötrofiller üzerine etkisi

Kemotaksin azalması
Fagositozun azalması
Oksidatif patlamanın azalması
Hücre içi öldürme kapasitenin azalması

Bakteriler demiri ağırlıklı olarak iki mekanizma ile alır ve çoğalmaları için kullanırlar. Dolaşımda serbest elemental demir olduğunda bazı bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Salmonella*) tarafından düşük molekül ağırlıklı şelatörler (sideroforlar) salınarak demiri alabilirler [97, 98]. İkincisi siderofor bağımsız bir mekanizma olup *S. aureus* ve *H. influenza* gibi bakteriler tarafından kullanılan transferin reseptörü aracılığı ile dolaşımdan demiri alırlar [98].

HD hastalarında yapılan çalışmalarda kullanılan demir dozu arttıkça enfeksiyon sıklığında artış bildirilmiştir. Bir çalışmada ferritin düzeyi 1000 µg/L'den fazla olanlarda bir diğer çalışmada ise ferritin düzeyi 500 µg/L'den fazla olanlarda bakteriyel enfeksiyon sıklığının arttığı bildirilmiştir [99, 100]. Randomize, çok merkezli 607 HD hastasının dahil edildiği bir çalışmada ferritin düzeyinin 500 µg/L'den fazla olması enfeksiyon riskini artıran değişkenlerden biri olarak tanımlanmıştır [101]. HD hastalarında yürütülen ileriye dönük bir çalışmada intravenöz demir süroz kullanımının süresi ve dozu ile enfeksiyon sıklığı incelenmiştir. Demir süroz birinci gruba haftada 3 kez 100 mg toplam 1000 mg ikinci gruba haftada 3 kez 100 mg toplam 2000 mg ve üçüncü gruba haftada bir kez 100 mg toplam 1000 mg uygulanmış. Enfeksiyon sıklığının ikinci grupta arttığı bildirilmiş ve intravenöz demir kullanımının süresinin değil kullanılan dozun enfeksiyon sıklığını arttırdığı rapor edilmiştir [102].

Hemodiyaliz hastalarında yürütülen bir çalışmada tek doz demir sürozun (30 ve 100 mg) lökosit yüzey antijenlerine (CD11b, CD14, CD36 ve CD45) etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada T lenfosit belirteçleri çalışılmamıştır [50].

Hemodiyaliz hastalarında elde edilen hücrelerin kültüründe demir glukonat, demir süroz ve demir dekstran'ın (25, 50 ve 100 µg/mL) lenfosit dağılımına (CD4, CD16, CD40 ve CD56) etkisini inceleyen bir çalışmada CD4 ve CD16 pozitif hücrelerde azalma görülmüştür. Aynı çalışmada demir süroz ve demir glukonatın demir

dekstran ile karşılaştırıldığında CD4 ve CD16 pozitif hücreleri daha fazla azalttığı bildirilmiştir [51]

Amaç: Demir sükröz ve demir dekstran'ın sıçanlarda periferik kanda lenfosit dağılımı ve işlevleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Çalışmanın etik kurulu

Bu çalışma DEÜTF “Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu” tarafından 05.07.2010 tarih ve 14109 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra yapılmıştır.

2. Kullanılan hayvanların sayısı ve türü

Çalışmada 18 adet, yetişkin erkek, ağırlıkları 300–350 gram arasında değişen Wistar albino sıçan kullanıldı.

3. Araştırmada kullanılan deney hayvanlarının bakım yeri, süresi ve koşulları

Tüm hayvanlar Deney Hayvanları Biriminde en uygun koşullarda barındırıldı ve standart yem ve su ile beslendi. Çalışmada kullanılan sıçanlar DEÜTF Multidisipliner Laboratuvarının standart kafesleme koşullarında, 3'lü kafeslerde standart yemleme ve su ile 2 günlük çalışma dönemi süresince barındırıldı.

4. Kullanılan anestezi ve analjezi türü

Çalışmada anestezi için eter kullanıldı.

5. Deneysel Tasarı

Çalışma süresi 2 gün olarak belirlendi. Çalışmaya alınan sıçanlar çalışma öncesi tartıldı ve her grupta altı sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki sıçanlardan -1. günde eter anestezisi altında kuyruk veninden 24 G branülle girilerek EDTA'lı tüpe 0,4 ml ve biyokimya tüpüne 0,7 ml kan alındı. Resim 1'de sıçanlardan kan alma işlemi gösterilmiştir. Kan alma işleminden 24 saat sonra; birinci gruba (serum fizyolojik=SF) uygulamak için serum fizyolojik hazırlandı. İkinci gruba (demir sükröz=DS grubu) uygulamak için 500 mg demir sükröz (Venofer, Abdi İbrahim İlaç San ve Tic A.Ş. İstanbul, Türkiye) 25ml SF içinde seyreltilerek 50 ml'lik çözelti elde edildi. Üçüncü gruba (demir dekstran=DD) uygulamak için 500 mg demir dekstran (Cosmofer®, Say İlaç, Edirne, Türkiye) 40 ml SF içinde seyreltilerek 50 ml'lik çözelti elde edildi.

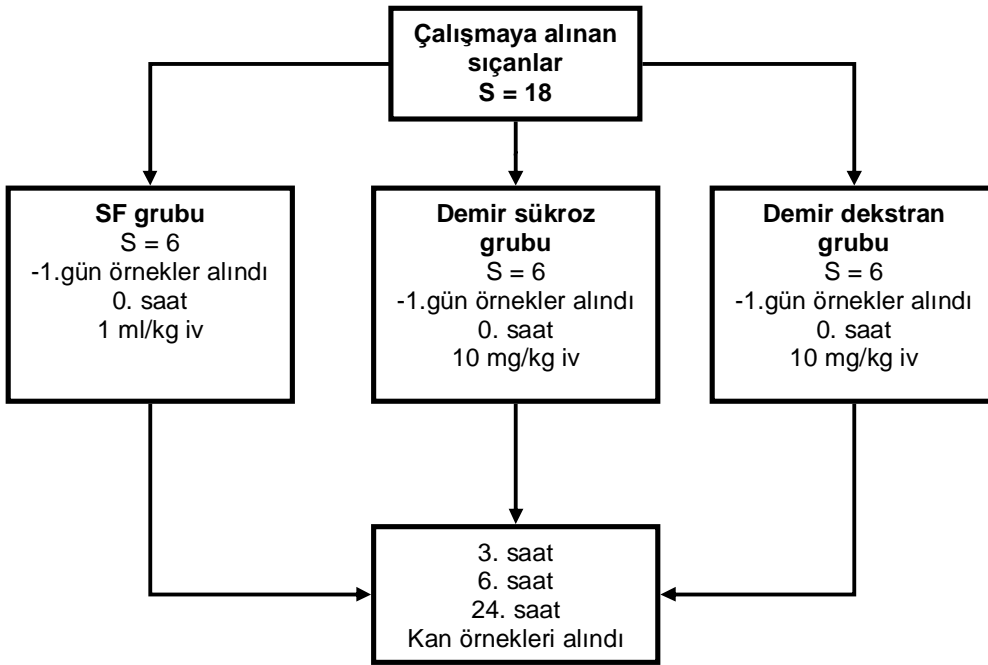
SF grubundaki altı sıçana eter anestezisi altında kuyruk venine 24 G branülle girilerek 1ml/kg SF yavaş puşe verildi. DS grubundaki altı sıçana 10 mg/kg demir sükröz yavaş puşe verildi. DD grubundaki altı sıçana 10 mg/kg demir dekstran yavaş puşe verildi. Her sıçana yapılan enjeksiyon zamanı kaydedildi. Enjeksiyondan sonra

her sıçandan 3. , 6. ve 24. saatlerde eter anestezisi altında kuyruk veninden 24 G branülle girilerek EDTA'lı tüpe 0,4 ml ve biyokimya tüpüne 0,7 ml kan alındı. Şekil 2'de çalışma şeması gösterilmiştir.

Resim 1. Sıçanlardan kan alma işlemi



Şekil 2. Çalışma şeması



6. Örneklerin hazırlanması

Biyokimyasal analizler için sıçanlardan alınan kan örnekleri, 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst fazda elde edilen serum örnekleri porsiyonlanarak eksi 80 °C'de analiz gününe kadar saklandı.

7. Biyokimyasal Analizler

Demir-Demir Bağlama ve Ferritin Analizleri

Serum örneklerinde demir-demir bağlama kapasitesi ve ferritin analizleri, Abbott ticari kitleri ile Abbott Artitech C16000 otoanalizörde yapıldı. Transferrin satürasyon değerleri, demir ve demir bağlama değerleri ($\mu\text{g/dL}$) birbirine oranlanması ile hesaplandı ve % transferrin satürasyon olarak ifade edildi. Ferritin düzeyleri de ng/mL olarak ifade edildi.

TNF-a Analizi

Serum örneklerinde TNF- α , ELISA temelli Invitrogen marka (Kat No: KRC 3011) kit ile değerlendirildi. Kitin ölçüm aralığı 11.7–750 pg/mL arasındadır. Duyarlılığı ise 4 pg/mL 'dir. Analiz aşamaları aşağıda özetlenmektedir:

- 1) 96 kuyucuklu plak ve analiz çözeltileri oda sıcaklığına getirildi,
- 2) Liyofilize standart (2000 pg/mL), kitin önerdiği şekilde standart çözücü tampon ile çözüldü. 11.7, 23.4, 46.9, 93.8, 187.5, 375 ve 750 pg/mL olacak şekilde standart tamponu ile seri dilüsyon yapıldı,
- 3) Tüm kuyucuklara 100 µL standart /serum örnekleri eklendi,
- 4) Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı,
- 5) Tüm kuyucuklara 100 µL Biotin ile işaretli ikincil antikor eklendi,
- 6) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı,
- 7) Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin-peroksidaz konjugatı eklendi,
- 8) Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı,
- 9) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı,
- 10) Tüm kuyucuklara 100 µL renk reaktifi eklendi ve 30 dakika inkübe edildi,
- 11) İnkübasyon sonunda 100 µL reaksiyon durdurucu reaktif eklendi,
- 12) Kuyucuklarda oluşan renkli çözeltinin absorbansı 450 nm de okundu,
- 13) Serum örneklerindeki TNF- α düzeyi, oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanarak hesaplandı. Sonuçlar mL başına pg TNF- α (pg/mL) olarak ifade edildi.

İnterferon-g (IFN-g) Analizi

Serum örneklerinde IFN- γ düzeyleri, ELISA temelli eBioscience marka (Kat No: BMS 621) kit ile değerlendirildi. Kitin ölçüm aralığı 31.3-2000 pg/mL arasındadır. Duyarlılığı ise 9.9 pg/mL'dir.

- 1) 96 kuyucuklu plak ve analiz çözeltileri oda sıcaklığına getirildi,
- 2) Liyofilize standart (2000 pg/mL), kitin önerdiği şekilde distile su ile çözüldü. 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ve 2000 pg/mL olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı,
- 3) Tüm kuyucuklara 100 µL standart /serum örnekleri eklendi,
- 4) Tüm kuyucuklara 50 µL Biotin ile işaretlenmiş ikincil antikor eklendi,
- 5) Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı,
- 6) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı,
- 7) Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin-peroksidaz konjugatı eklendi ve 1 saat inkübe edildi,

- 8) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı,
- 9) Tüm kuyucuklara 100 µL 3,3',5,5'Tetrametilbenzidin(TMB)/Hidrojen Peroksit) substrat reaktifi eklendi ve 10 dakika inkübe edildi,
- 10) İnkübasyon sonunda 100 µL reaksiyon durdurucu reaktif eklendi,
- 11) Kuyucuklarda oluşan renkli çözeltinin absorbansı 450 nm de okundu,
- 12) Serum örneklerindeki IFN-γ düzeyi, oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanarak hesaplandı. Sonuçlar mL başına pg TNF-α (pg/mL) olarak ifade edildi.

IL-2 Analizi

Serum örneklerinde IL-2 düzeyleri, ELISA temelli Boster marka kit ile değerlendirildi. Kitin ölçüm aralığı 15.6-1000 pg/mL arasındadır. Duyarlılığı ise 1 pg/mL' dir. Analiz aşamaları aşağıda özetlenmektedir:

- 1) 96 kuyucuklu plak ve analiz çözeltileri oda sıcaklığına getirildi,
- 2) Liyofilize standart (1000 pg/mL), kitin önerdiği şekilde distile su ile çözüldü. 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 pg/mL olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı,
- 3) Tüm kuyucuklara 100 µl standart /serum örnekleri eklendi ve 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi,
- 4) İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve tüm kuyucuklara 100 µL Biotin ile işaretlenmiş ikincil antikor eklendi,
- 5) 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı,
- 6) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı,
- 7) Tüm kuyucuklara 100 µL Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleks (ABC) reaktifinden eklendi,
- 8) 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı,
- 9) İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı,
- 10) Tüm kuyucuklara 100 µL 3,3',5,5'Tetrametilbenzidin(TMB)/Hidrojen Peroksit) substrat reaktifi eklendi ve 20 dakika inkübasyona bırakıldı,
- 11) İnkübasyon sonunda 100 µL reaksiyon durdurucu reaktif eklendi
- 12) Kuyucuklarda oluşan renkli çözeltinin absorbansı 450 nm de okundu,

- 13) Serum örneklerindeki IL-2 düzeyleri, oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanarak hesaplandı. Sonuçlar mL başına pg IL-2 (pg/mL) olarak ifade edildi.

9. Sıçan Periferik Kanında Lenfosit Alt Gruplarının Akım Sitometrik Analizi

Gerekli materyaller

- 1) 12x75 mm'lik polystyrene Falcon tüpler (BD Biosciences, 352052)
- 2) Sıçan T lenfosit paketi (BD Biosciences, 558493)
Anti-Rat CD3 APC
Anti-Rat CD4 PE
Anti-Rat CD8a FITC
- 3) Sıçan aktive T lenfosit paketi (BD Biosciences, 558494)
Anti-Rat CD3 APC
Anti-Rat CD25 PE
Anti-Rat RT1B FITC
- 4) Mouse Anti-Rat CD11b FITC (BD Biosciences, 554982)
- 5) Mouse Anti-Rat CD161a PE (BD Biosciences, 555009)
- 6) Mouse Anti-Rat CD45RA PE-Cy5 (BD Bioscience, 557015)
- 7) İzotipik kontroller; Ig Isotype Control Cocktail-B (BD Bioscience, 558508)
Mouse IgG1 FITC
Mouse IgG2a PE
Mouse IgM APC
- 8) İzotipik kontrol: mouse IgG1 κ Isotype Control (BD Bioscience, 550618)
- 9) BD FACS™ Lysing Solution (BD Bioscience, 349202)
- 10) Akım sitometri cihazı, BD FACSCalibur™ Flow cytometer (Referans no: 342975, seri no: E97501117, Oct. 2008) ve CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA 95131, USA)
- 11) Fosfat tamponu (pH: 7.2); NaCl (137 mM), KCl (2.4 mM), Na₂KPO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (0.2 mM).

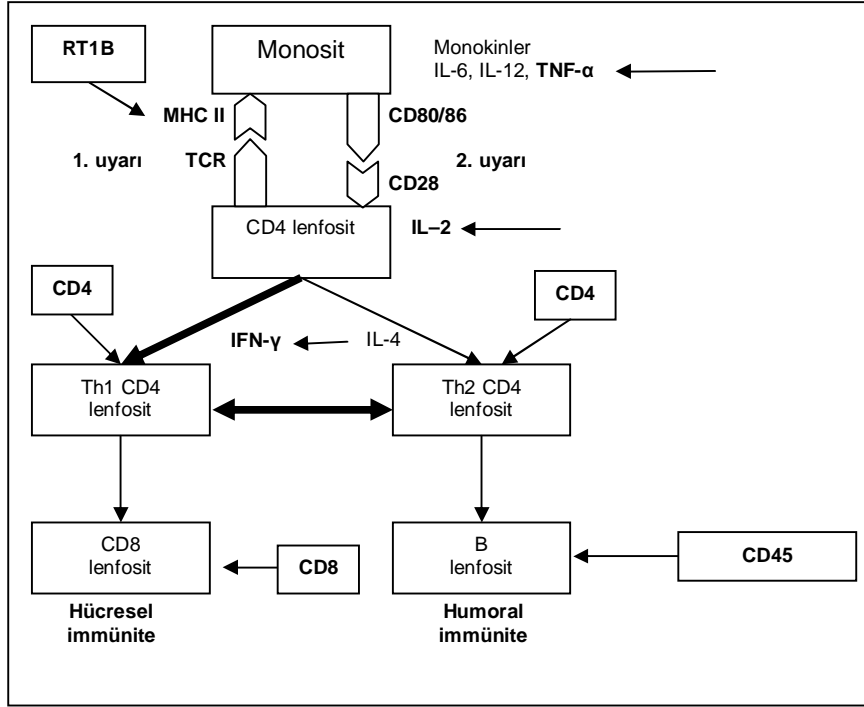
Sıçan Lenfositlerinin Monoklonal Antikorlarla Boyanması

- 1) Dört ayrı 12x75 mm'lik test tüplerine 100'er µL rat periferik kanı konuldu,
- 2) Birinci tüpe izotipik kontroller, ikinci tüpe sıçan T lenfosit paketi antikorları, üçüncü tüpe Rat Activated T Lymphocyte Cocktail antikorları ve dördüncü tüpe Mouse Anti-Rat CD11b FITC, Anti-Rat CD161a PE ve Anti-Rat CD45RA PE-Cy5 monoklonal antikorları üretici firmanın önerdiği şekilde 20'şer µL ilave edildi,
- 3) Tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra oda ısısında, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi,
- 4) İnkübasyon sonunda tüplere 1 ml eritrositleri parçalayıcı solusyon ilave edildi,
- 5) Tüpler karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi,
- 6) Tüpler 1200 rpm (300 g) de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, hücre pelletine 2 ml fosfat tamponu (PBS) ilave edilerek yıkama işlemi yapıldı,
- 7) Yıkama işlemi üç kez tekrar edildi,
- 8) Son yıkamadan sonra hücre pelleti 500 µL PBS'de yıkanarak edilerek akım sitometri cihazında analiz için hazır hale getirildi.

Sıçan Lenfosit Alt Gruplarının Akım Sitometrik Analizi

Hazırlanan örnekler akım sitometri cihazından geçirildi (acquiring). Toplam 20000 hücre sayıldı. CellQuest programında ön saçılım (forward scatter-FSC) ve yan saçılım (side scatter-SSC) sinyallerinin log aritmik amplifikasyonu ile hücre boyut ve granüleritesine göre oluşturulan noktasal grafikte (dot-plot) lenfositler seçildi (kapı alındı). İzotipik kontrollere göre eşik değerler belirlendi. Lenfosit alt gruplarının hücre yüzey ekspresyonları ikişer renkli fluoresans noktasal grafik görüntüsü üzerinde değerlendirildi. İkinci tüpte toplam T lenfositler, T helper ve T supressor/sitotoksik lenfositler, üçüncü tüpte aktive T lenfositler ve dördüncü tüpte B lenfositler, natural killer lenfositler ve aktif nötrofiller yüzde olarak belirlendi.

10. Çalışılan Parametrelerin Bağışıklık Sistemi Basamaklarındaki Yerleri



11. İstatistiksel Analiz

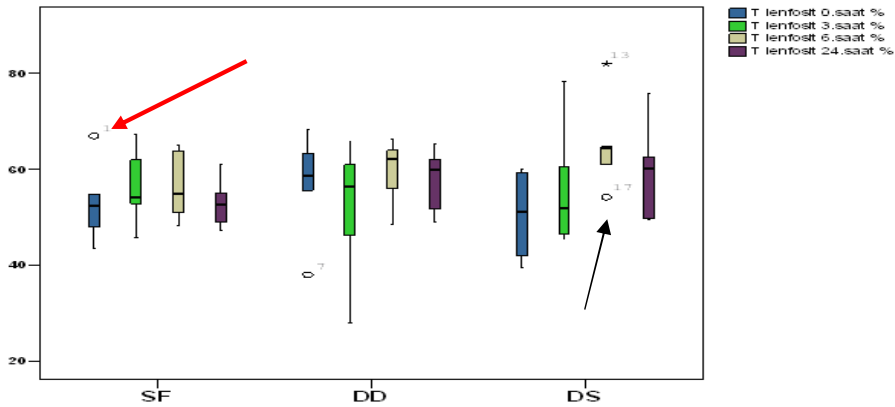
Çalışmaya dahil edilen denek sayısı 20'nin altında olduğundan ve kıyaslamalı analizlerde değerlendirilen grupların her birinde toplam 6 denek bulunduğundan nonparametrik istatistiksel analizler kullanıldı. Çoklu bağımlı gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde Friedman testi, çoklu bağımsız 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 11.0 versiyonu ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

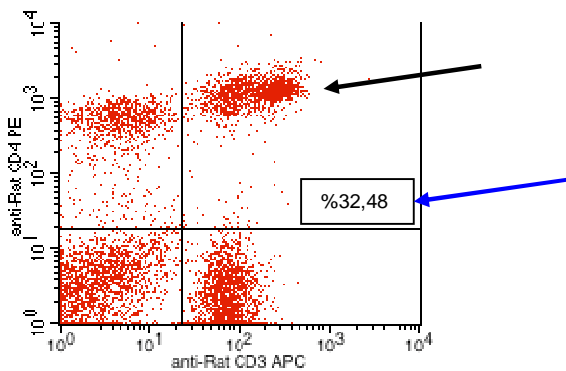
BULGULAR

Bulgular sunulmadan önce grafiklerin daha kolay anlaşılması için akım sitometri grafikleri ve bazı grafiklerde yer alan rakamların ne anlama geldiği aşağıda sunulmuştur.

Ok işareti ile gösterilen rakamlar örneğin sırasını belirlemektedir. Örneğin kırmızı okun işaret ettiği 1 rakamı 1. sıçanın değerini ifade etmektedir. Siyah okun işaret ettiği 17 rakamı 17. sıçanın değerini göstermektedir. Yatay satırda grupların isimleri yer almaktadır. Grafik sağ üst yanında değişkenler ve birimleri verilmektedir.



Akım sitometri örneklerinde kırmızı renkli her nokta bir hücreyi ifade etmektedir. Siyah ok ile gösterilen sağ üst karede yer alan hücreler hem X hem de Y sütununda yer alan antikorlarla pozitif boyanan hücrelerdir. Bu örnekte siyah ok ile gösterilen sağ üst kare $CD3^+/CD4^+$ hücreleri yani T helper lenfositleri ifade etmektedir. Mavi ok ise sağ üst karede yer alan hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir.



Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

1- Toplam Lenfosit Sonuçları

Kontrol grubu (SF) ile karşılaştırıldığında, demir sükroz (DS) ve demir dekstran (DD) grubunda toplam lenfosit yüzdeleri açısından 0, 3, 6 ve 24. saatlerde farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). DS ile DD grubu arasında toplam lenfosit yüzdesi açısından farklılık saptanmamıştır. Tüm grupların toplam lenfosit yüzdeleri Tablo 4'te verilmiştir. Grupların toplam lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması Grafik 1'de gösterilmiştir.

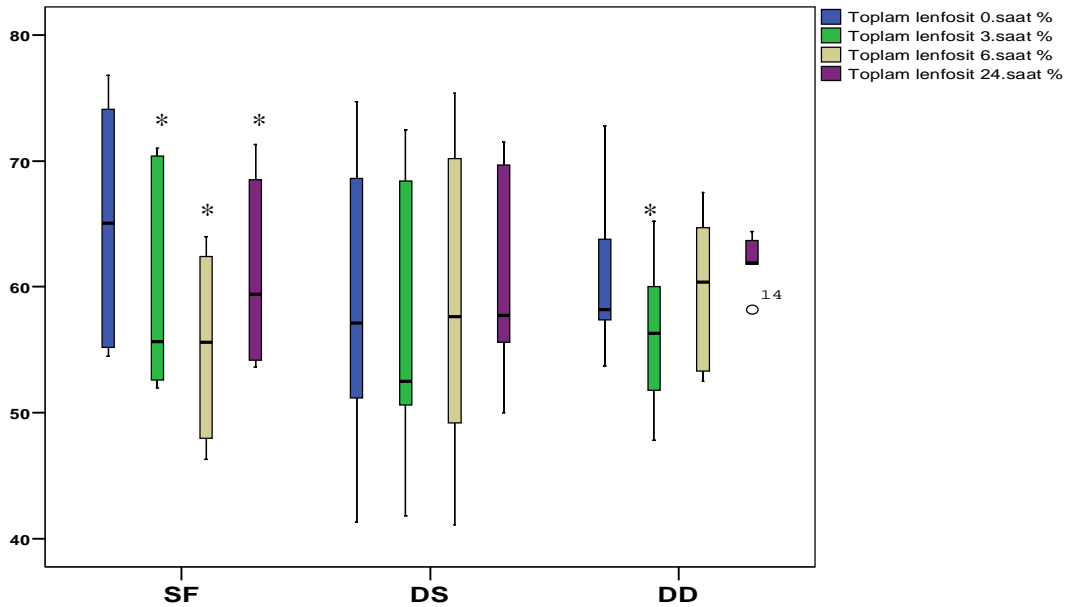
Tablo 4. Grupların toplam lenfosit yüzdeleri

Toplam Lenfosit (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	65,11±9,2	58,33±12	60,68±6,7	AD ^{a, b, c}
3. saat	59,55±8,77*	56,38±11,6	56,23±6,1*	AD ^{a, b, c}
6. saat	55,3±7,2*	58,53±12,9	59,8±6,5	AD ^{a, b, c}
24. saat	61,06±7,3	60,38±8,4	62,13±1,8	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 1. Grupların toplam lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması



* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

2. T Lenfosit Sonuçları

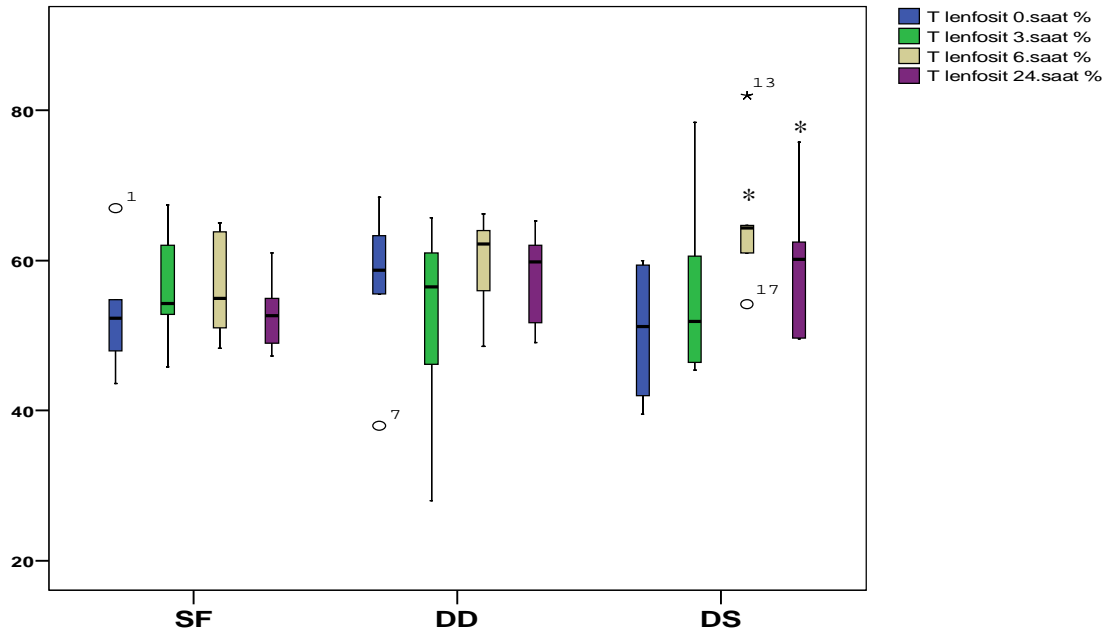
Kontrol, DS ve DD grupları arasında T lenfosit yüzdeleri açısından 0, 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). DD grubu içinde 6 ve 24. saatte T lenfosit sayısında anlamlı artış belirlenmiştir ($p<0,05$). Grupların T lenfosit yüzdeleri Tablo 5'de verilmiştir. Grupların T lenfosit yüzdelerinin karşılaştırılması Grafik 2'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Grupların T lenfosit (CD3⁺) yüzdeleri

T Lenfosit (CD3 ⁺) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	52,5±7	58,28±7,9	50,55±8,5	AD ^{a, b, c}
3. saat	55,68±6,9	53,98±10,3	55,7±12,4	AD ^{a, b, c}
6. saat	56,25±6,6	59,88±6,4	65,33±8,8*	AD ^{a, b, c}
24. saat	52,26±3,6	57,95±6,2	59,65±9,6*	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında
* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 2. Grupların toplam T lenfosit (CD3⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması



* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

3. T helper Lenfosit Sonuçları

DS verilen grupta 3, 6 ve 24. saatlerde T helper lenfositlerin yüzdesinde anlamlı düşüş saptandı. DS grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3, 6 ve 24. saatlerde T helper lenfositlerin yüzdelerinde anlamlı bir azalma gösterilmiştir ($p<0,05$). DD grubunda T helper lenfosit yüzdeleri DS grubuna göre 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). SF grubu ile DD grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. DS grubu içinde 3, 6 ve 24. saatlerde 0.saat ile karşılaştırıldığında T helper lenfosit yüzdesinde belirgin azalma gözlenmiştir. Grupların toplu sonuçları Tablo 6'da bir arada sunulmuştur. Grupların T helper yüzdelerinin 0, 3, 6 ve 24. saatte karşılaştırılması sırası ile Grafik 3.1, Grafik 3.2., Grafik 3.3. ve Grafik 3.4.'te gösterilmiştir. Grafik 3.5.'de DD ve DS gruplarından seçilmiş örnek akım sitometri sonuçları gösterilmiştir.

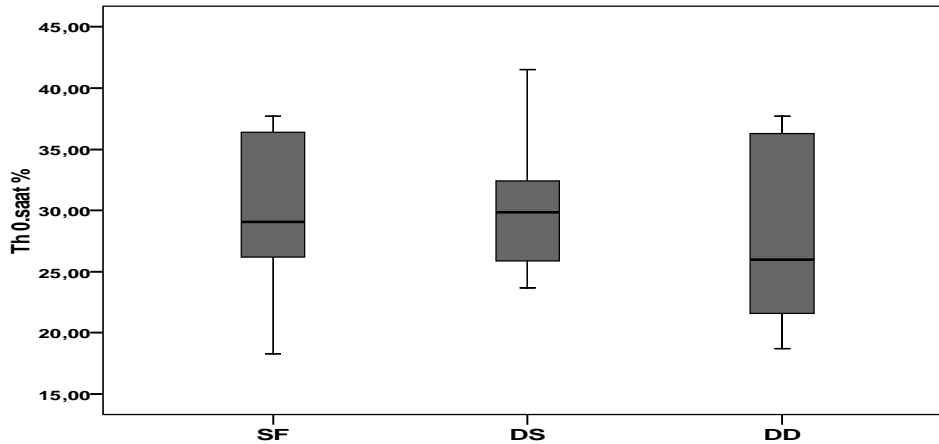
Tablo 6. Grupların T helper (CD3⁺/CD4⁺) yüzdeleri

T helper (CD3 ⁺ /CD4 ⁺) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	29,45±7,2	30,53±6,2	27,71±8	AD ^{a, b, c}
3. saat	31,78±8	20,78±7,1*	32,48±6,8*	<0,05 ^{a, c}
6. saat	32,95±8,7	23,05±4,5*	40,56±9,3*	<0,05 ^{a, c}
24. saat	30,3±5,7	20,65±3,9*	31,73±6,7	<0,05 ^{a, c}

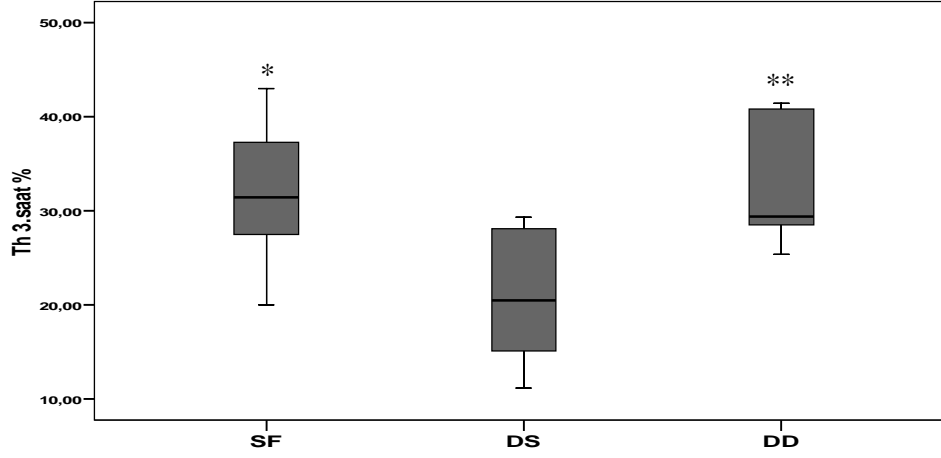
AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

*: $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 3.1. Grupların T helper 0. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelерinin karşılaştırılması

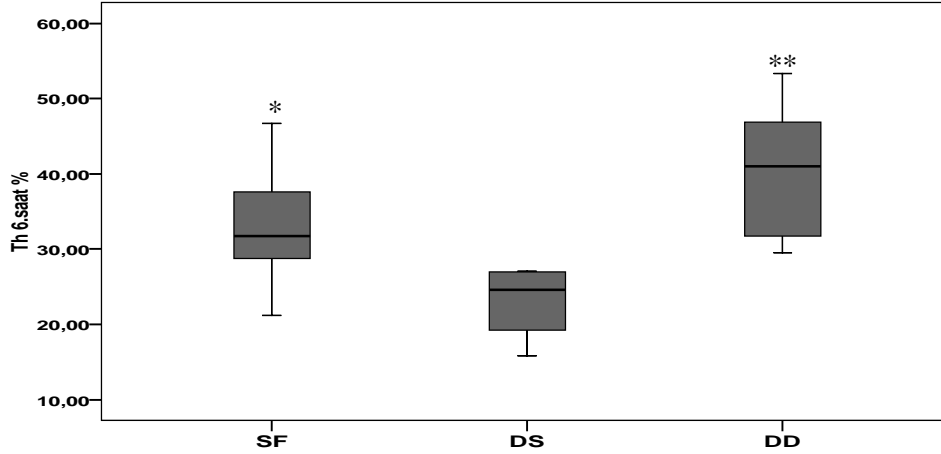


Grafik 3.2. Grupların T helper 3. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelерinin karşılaştırılması



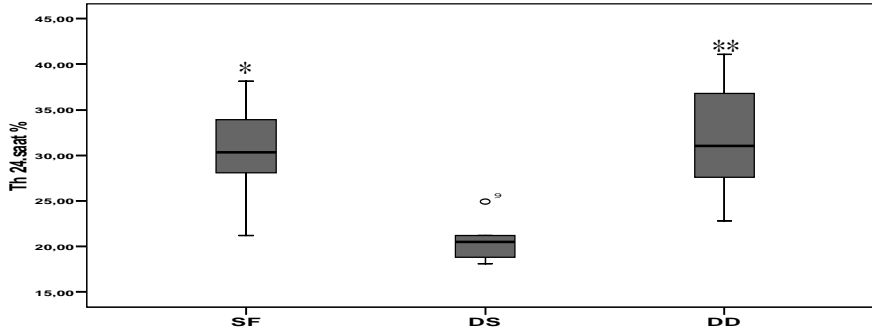
* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Grafik 3.3. Grupların T helper 6. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelерinin karşılaştırılması



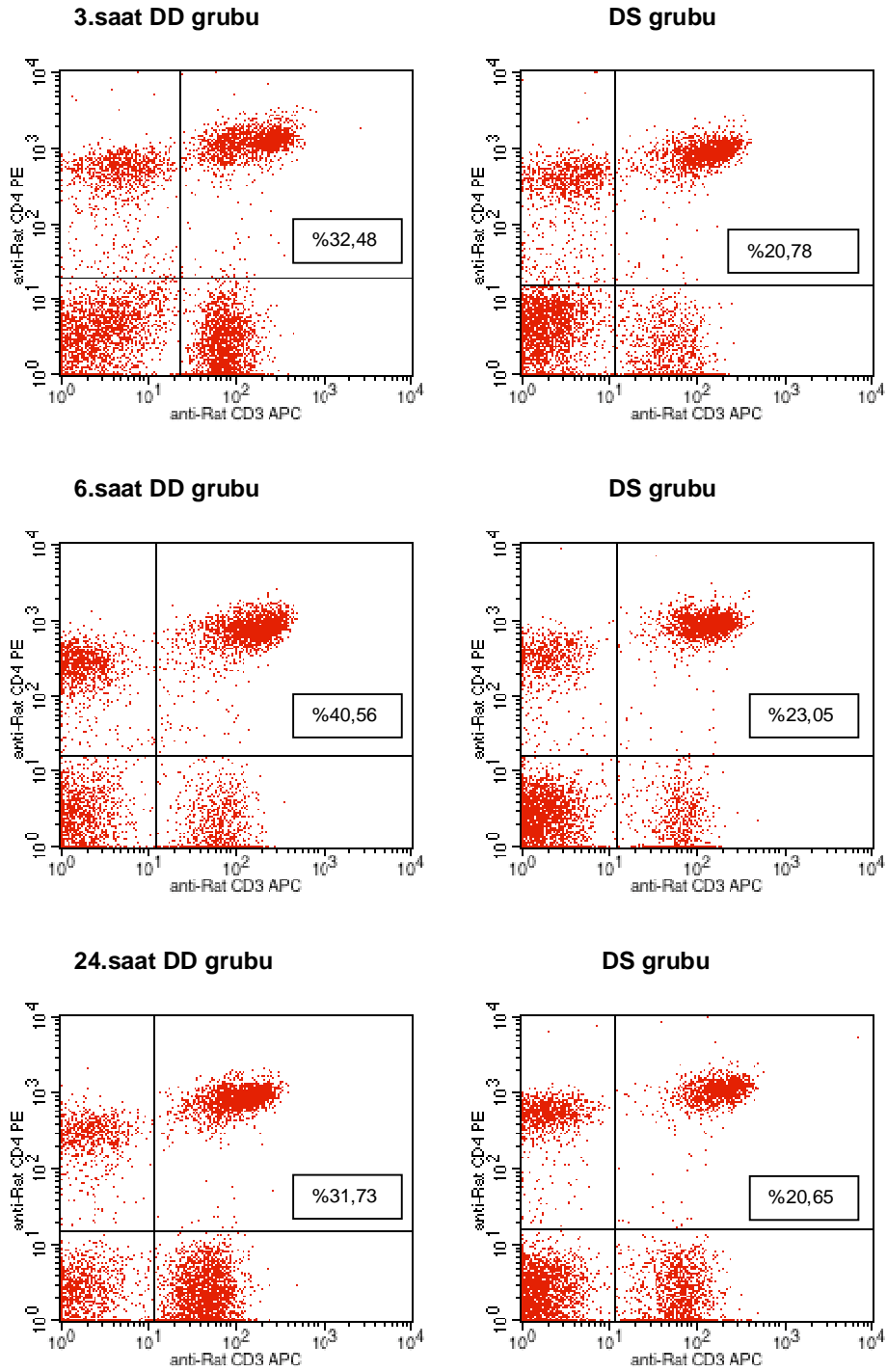
* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Grafik 3.4. Grupların T helper 24. saat (CD3⁺/CD4⁺) yüzdelерinin karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Grafik 3.5. Demir dekstran ve demir sükröz gruplarının akım sitometrik T helper (CD3⁺/CD4⁺) sonuçları



4. T supressor/sitotoksik Lenfosit Sonuçları

Kontrol ve DD gruplarında Ts lenfosit yüzdelerinde 3, 6 ve 24. saatlerde değişiklik gözlenmedi. DS grubunda 3. saatte artış saptanan anlamlı artışın 6. ve 24. saatlerde de devam ettiği görülmüştür. SF grubu karşılaştırıldığında DS grubunda Ts lenfositler 6. ve 24. saatte anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). SF grubu ile DD grubu karşılaştırıldığında Ts lenfosit yüzdelerinde 3, 6 ve 24. saatler farklılık saptanmadı ($p>0,05$). DS grubunda DD grubuna göre Ts lenfosit yüzdeleri daha yüksek bulunsada istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Grupların sonuçları Tablo 7'de verilmiştir. Grafik 4'te grupların T supressor/sitotoksik ($CD3^+/CD8^+$) 6 ve 24. saat yüzdelerinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

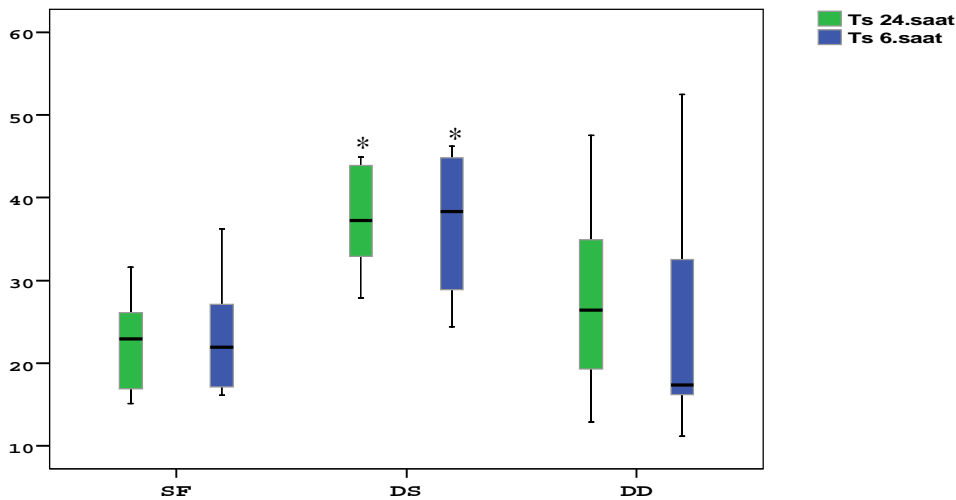
Tablo 7. Grupların T supressor/sitotoksik ($CD3^+/CD8^+$) yüzdeleri

T	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
supressor/sitotoksik				
($CD3^+/CD8^+$) (%)				
0. saat	23,55±9,5	26,58±12,9	22,83±12,7	AD ^{a, b, c}
3. saat	24,3±8,1	31,53±9,9*	23,26±13,3	AD ^{a, b, c}
6. saat	23,38±8	36,83±8,6*	24,53±15,4	<0,05^a
24. saat	22,6±6,1	37,33±6,79*	27,91±12,1	<0,05^a

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

*: $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 4. Grupların T supressor/sitotoksik ($CD3^+/CD8^+$) yüzdelerinin karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$

5. Th/Ts (CD4/CD8) Oranı Sonuçları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda Th/Ts oranında 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). DS grubu ile karşılaştırıldığında DD grubunda Th/Ts oranı 3, 6 ve 24 saatlerde belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Grupların sonuçları Tablo 8'de verilmiştir. Grafik 5'de grupların T helper/T supressor oranlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

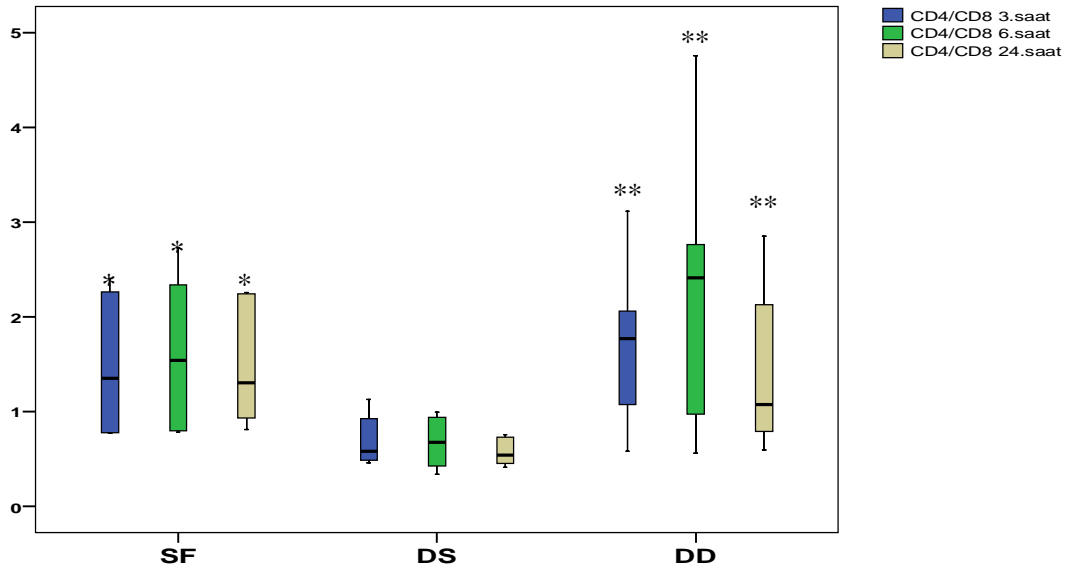
Tablo 8. Grupların T helper/T supressor/sitotoksik (CD4⁺/CD8⁺) oranları

CD4/CD8 Oranı	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	1,48±0,8	1,64±1,2	2,01±2,2	AD ^{a, b, c}
3. saat	1,48±0,7	0,69±0,3*	1,72±0,8	<0,05 ^{a, c}
6. saat	1,62±0,8	0,67±0,2*	2,31±1,5	<0,05 ^{a, c}
24. saat	1,47±0,6	0,57±0,1*	1,41±0,9	<0,05 ^{a, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 5. Grupların T helper/T supressor/sitotoksik (CD4⁺/CD8⁺) oranlarının karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$

6. Aktive T Lenfosit (CD25⁺) Sonuçları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda aktive T lenfosit yüzdesinde 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). DD grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda CD25⁺ lenfosit yüzdesi 3, 6 ve 24 saatlerde anlamlı şekilde düşük saptanmıştır ($p<0,05$). SF grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). CD25⁺ lenfositler DS ve DD gruplarında kendi içinde azalmıştır ancak DS grubundaki daha fazla azalmıştır. Grupların sonuçları Tablo 9'da verilmiştir. Grafik 6.1'de grupların aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) 3, 6 ve 24. saat yüzdelerinin karşılaştırılması görülmektedir. Grafik 6.2'de DD ve DS gruplarının akım sitometrik aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) 3, 6 ve 24. saat sonuçlarından örnekler görülmektedir.

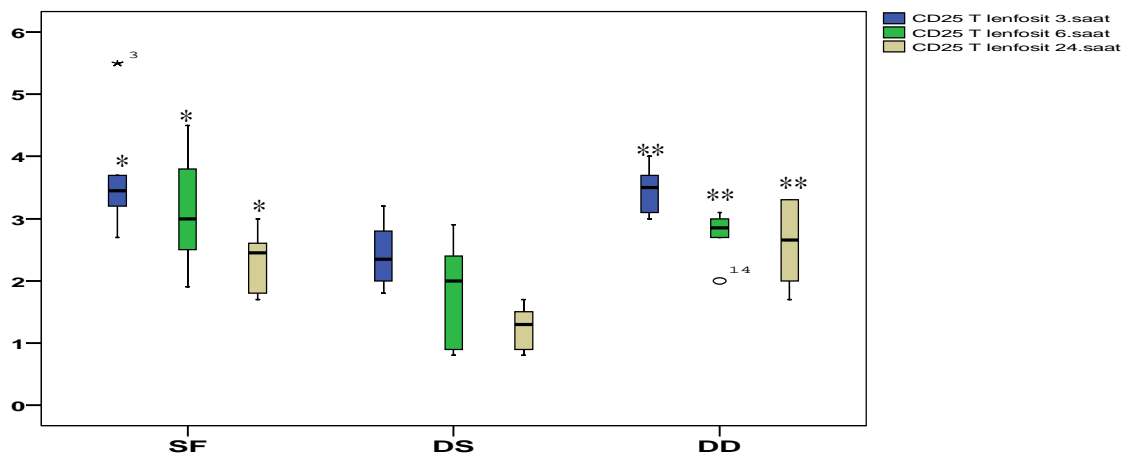
Tablo 9. Grupların aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) yüzdeleri

Aktive T lenfosit (CD3 ⁺ /CD25 ⁺) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	3,43±0,5	2,76±0,4	3,21±0,6	AD ^{a, b, c}
3. saat	3,46±0,5	2,61±0,7	3,46±0,4	<0,05 ^{a, c}
6. saat	3,11±0,9	1,83±0,8*	2,75±0,4*	<0,05 ^{a, c}
24. saat	2,33±0,4*	1,25±0,3*	2,6±0,7*	<0,05 ^{a, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

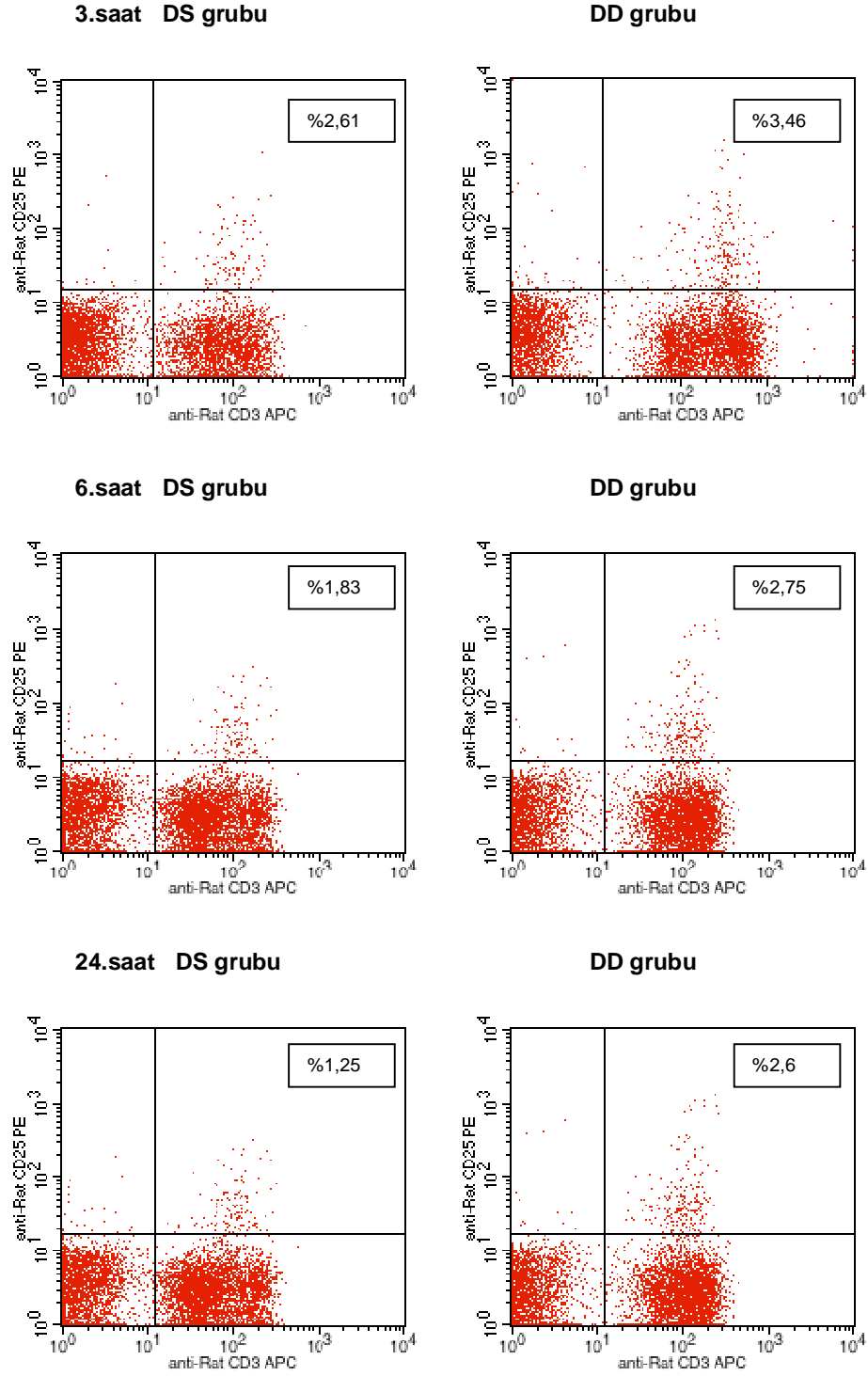
* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 6.1. Grupların aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) 3, 6 ve 24.saat yüzdelerinin karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$

Grafik 6.2. Demir sükröz ve demir dekstran gruplarının akım sitometrik aktive T lenfosit (CD3⁺/CD25⁺) sonuçları



7. 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 (APC) yüzdesi DS ve DD gruplarında azalmış olmasına rağmen DS grubundaki azalma DD grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla idi. Ayrıca APC yüzdesi DS grubunda 3. saatten itibaren DD grubunda ise 6. saatten itibaren düşmeye başlamıştır. Kontrol grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Grupların sonuçları Tablo 10'da verilmiştir. Grupların antijen sunan hücre (RT1B) 0, 3 ve 6.saat yüzdelерinin karşılaştırılması grafik 7.1'de, 24. saat yüzdelерinin karşılaştırılması Grafik 7.2'de gösterilmiştir. Grafik 7.3'de DD ve DS için akım sitometrik antijen sunan hücre (RT1B) 24. saat sonuçlarından örnekler verilmiştir.

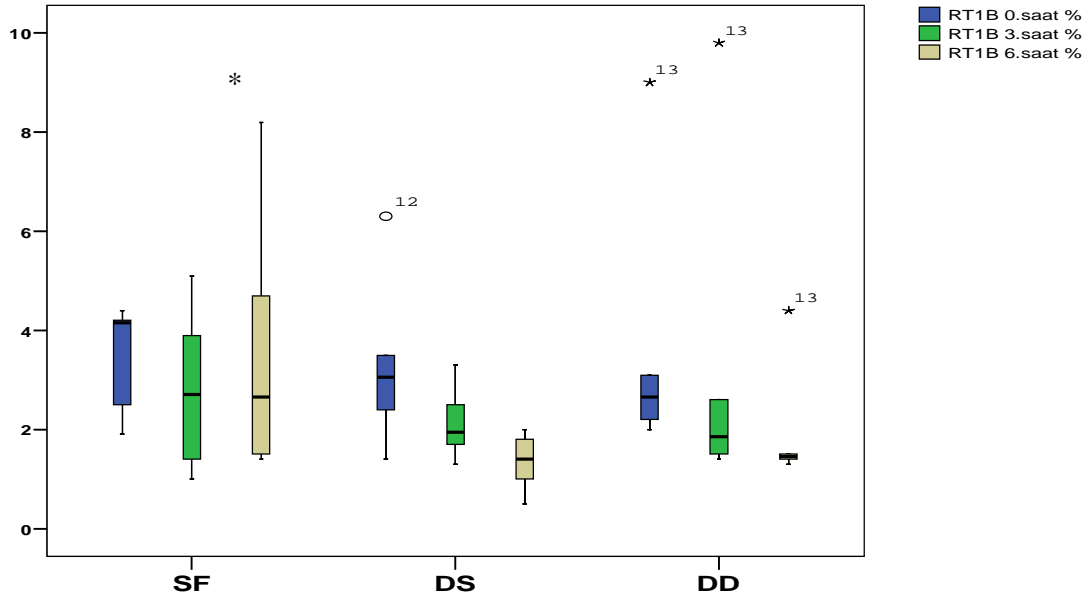
Tablo 10. Grupların antijen sunan hücre (CD3⁺/RT1B) yüzdeleri

Antijen sunan hücre (RT1B) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	3,55±1	3,28±1,6	3,6±2,6	AD ^{a, b, c}
3. saat	2,8±1,6	2,11±0,7*	3,16±3,2	AD ^{a, b, c}
6. saat	3,51±2,6	1,35±0,5*	1,91±1,2*	<0,05^a
24. saat	2,46±1,4*	0,88±0,4*	1,66±0,52*	<0,05^{a, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

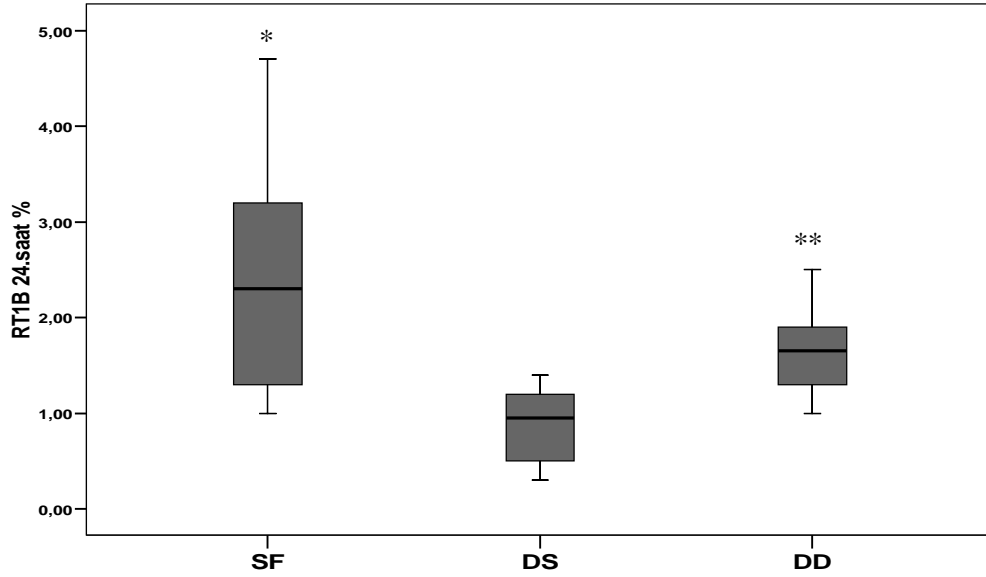
* $p<0,05$; kendi grubunun 0.saat değeri ile karşılaştırıldığında

Grafik 7.1. Grupların antijen sunan hücre (RT1B) 0, 3 ve 6.saat yüzdelерinin karşılaştırılması



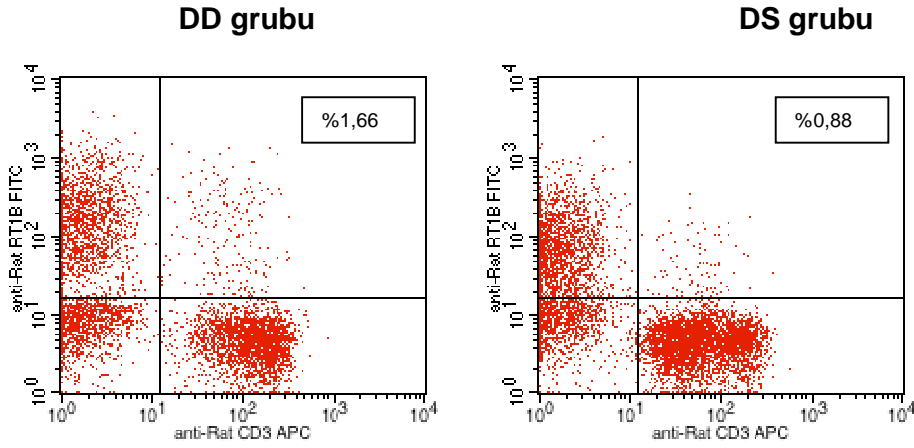
* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Grafik 7.2. Grupların antijen sunan hücre (RT1B) 24.saat yüzdelерinin karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Grafik 7.3. Demir dekstran ve demir sükröz gruplarının akım sitometrik antijen sunan hücre (RT1B) 24. saat sonuçları



8. B Lenfosit Sonuçları

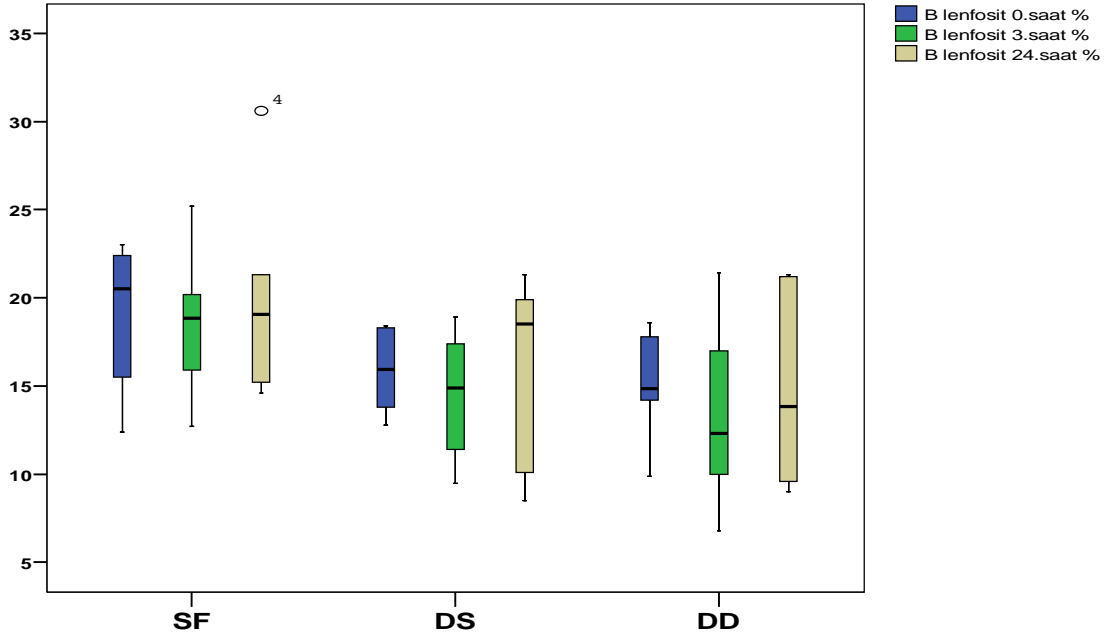
Grupların karşılaştırılmasında B Lenfositlerin yüzdesi açısından sadece 6.saatte farklılık saptanmıştır. Kontrol grubu ve DD grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda B lenfosit yüzdesinde 6.saatte anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). Grupların sonuçları Tablo 11'de verilmiştir. Grafik 8.1'de grupların B lenfosit (CD45RA⁺) 0, 3 ve 24.saat yüzdelerinin karşılaştırılması, Grafik 8.2'de 6.saat yüzdelerinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 11. Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) yüzdeleri

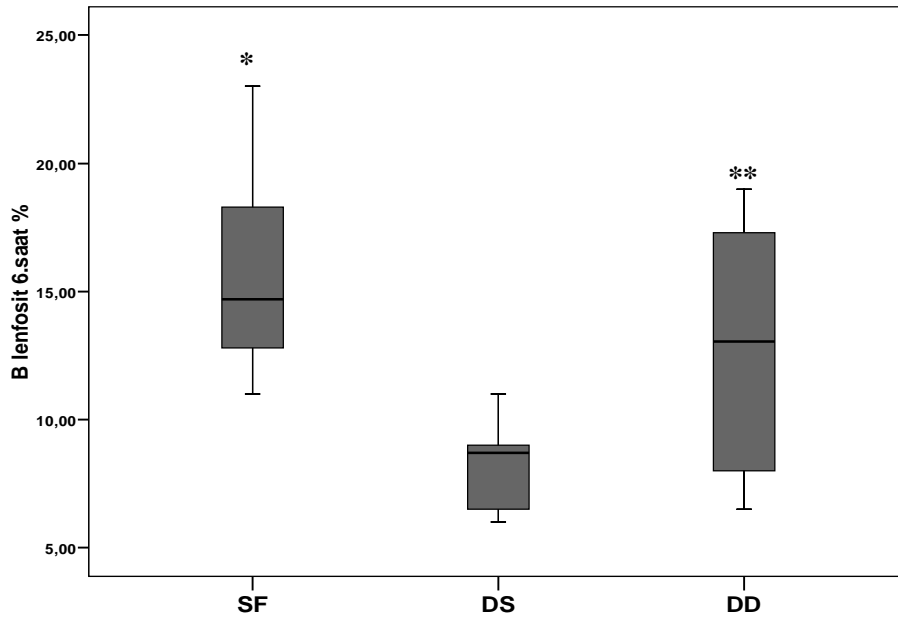
B lenfosit (CD45RA ⁺) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	19,05±4,2	15,86±2,4	15,03±3,1	AD ^{a, b, c}
3. saat	18,16±4,2	14,5±3,8	13,3±5,1	AD ^{a, b, c}
6. saat	15,75±4,3	8,81±4,9	13,81±1,8	<0,05 ^{a, c}
24. saat	19,45±4,7	16,13±5,4	14,8±5,4	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

Grafik 8.1. Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) 0, 3 ve 24.saat yüzdelerin karşılaştırılması



Grafik 8.2. Grupların B lenfosit (CD45RA⁺) 6.saat yüzdelerin karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

9. Natural Killer (CD161a⁺) Sonuçları

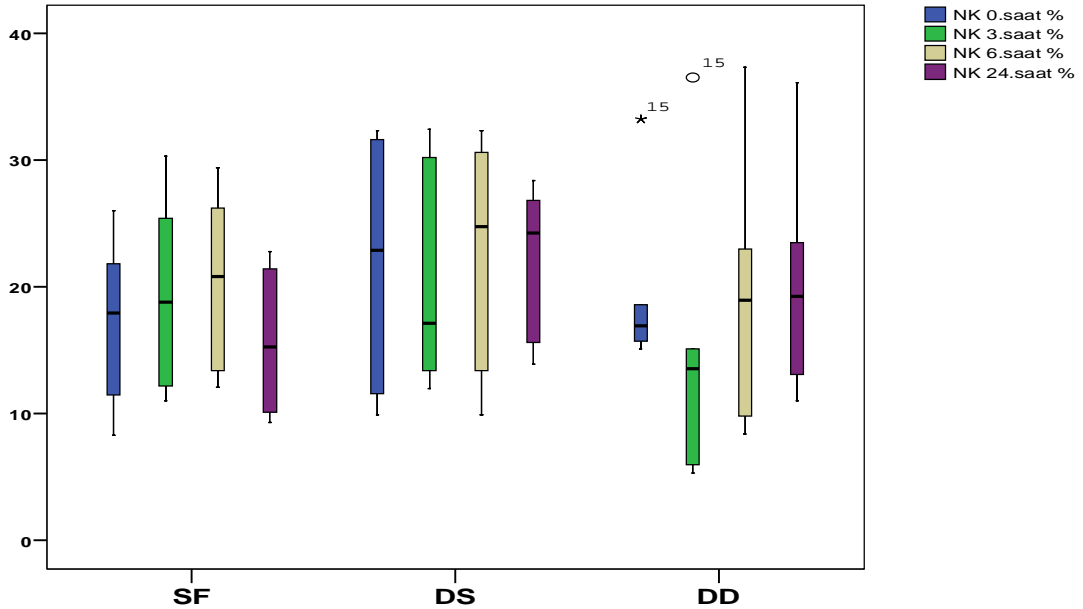
Grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda NK hücre yüzdeleri açısından 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Grupların sonuçları Tablo 12’de verilmiştir. Grafik 9’da grupların NK (CD161a⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 12. Grupların natural killer (CD161a⁺) yüzdeleri

Natural Killer (CD161a ⁺) (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	17,25±3,1	21,86±10,1	17,53±2,5	AD ^{a, b, c}
3. saat	19,41±5,1	20,38±8,7	18,33±7,2	AD ^{a, b, c}
6. saat	20,45±1,8	22,61±9,4	19,4±10,5	AD ^{a, b, c}
24. saat	15,68±5,4	22,2±6	20,36±8,9	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

Grafik 9. Grupların natural killer (CD161a⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması



10. Nötrofil (CD11b⁺) Sonuçları

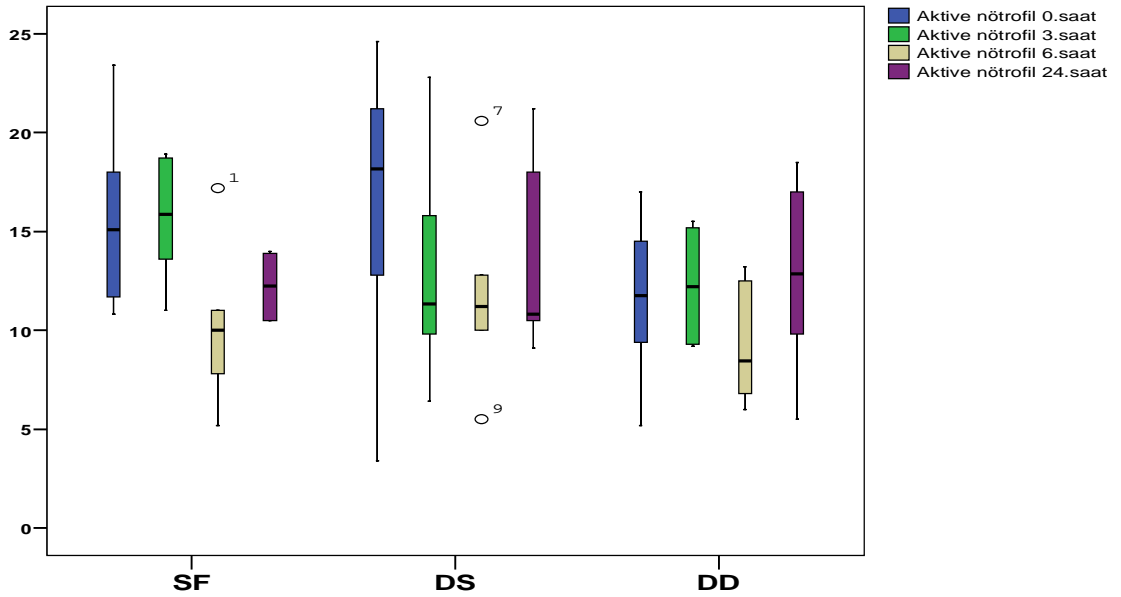
Grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda nötrofil yüzdeleri açısından 3, 6 ve 24. saatlerde anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05). Grupların sonuçları Tablo 13'te verilmiştir. Grafik 10'da grupların nötrofil (CD11b⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 13. Grupların nötrofil (CD11b⁺) yüzdeleri

Aktive nötrofil (%)	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	15,68±4,7	16,38±7,4	13,6±4,2	AD ^{a, b, c}
3. saat	15,65±3	12,91±5,7	12,11±3	AD ^{a, b, c}
6. saat	9,97±3,5	11,57±3,3	12,68±3,1	AD ^{a, b, c}
24. saat	12,23±1,6	13,4±4,9	12,75±4,8	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

Grafik 10. Grupların nötrofil (CD11b⁺) yüzdelerinin karşılaştırılması



11. IFN- γ Sonuçları

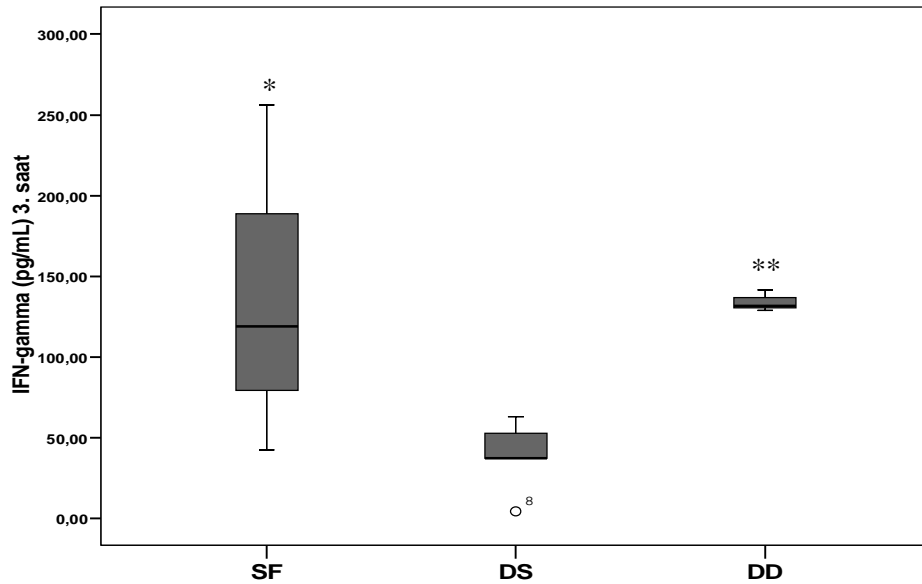
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DS grubunda 3. saatte IFN- γ da anlamlı bir baskılanma olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile DD grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. DD grubu ile DS grubu karşılaştırıldığında DS grubunda 3. saatte IFN- γ seviyesi anlamlı şekilde düşük saptanmıştır ($p<0,05$). Grupların sonuçları Tablo 14'de verilmiştir. Grafik 11'de grupların IFN- γ 3.saat sonuçlarının karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 14. Grupların IFN- γ sonuçları

IFN- γ	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
0. saat	105,34 \pm 11	92,16 \pm 103	216,09 \pm 195	AD ^{a, b, c}
3. saat	134,04 \pm 89	41,57 \pm 20,8	134,04 \pm 6,7	<0,05 ^{a, c}
6. saat	192,5 \pm 100	169,81 \pm 105	177,4 \pm 50	AD ^{a, b, c}
24. saat	159,05 \pm 47	190,09 \pm 128	228,69 \pm 116	AD ^{a, b, c}

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

Grafik 11. Grupların IFN- γ 3.saat sonuçlarının karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$

12. Demir, Demir Bağlama Kapasitesi ve Ferritin Sonuçları

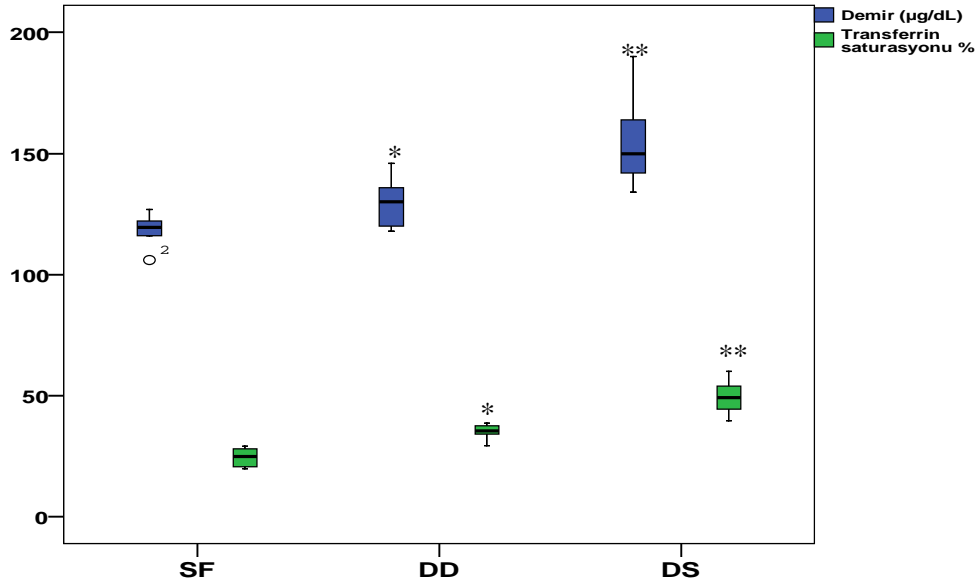
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem DS hem de DD grubunda daha yüksek demir, daha düşük demir bağlama kapasitesi ve daha yüksek transferrin saturasyonu saptandı ($p<0,05$). DS grubu ile DD grubu karşılaştırıldığında DS grubunda demir, transferin saturasyonu daha yüksek; demir bağlama kapasitesi daha düşük saptandı ($p<0,05$). Grupların sonuçları Tablo 15’de verilmiştir. Grupların demir ve transferin saturasyonlarının karşılaştırılması Grafik 12’de gösterilmiştir.

Tablo 15. Grupların demir, demir bağlama kapasitesi, transferin saturasyonu ve ferritin sonuçları

	SF grubu	DS grubu	DD grubu	p değeri
Demir ($\mu\text{g/dL}$)	118,3 \pm 7,1	155 \pm 19,9	130 \pm 10,8	<0,05^{a, b, c}
Demir Bağlama Kapasitesi ($\mu\text{g/dL}$)	492,7 \pm 78	319,2 \pm 51,7	372 \pm 21,2	<0,05^{a, b, c}
Transferin Satürasyonu (%)	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	>0,05

AD; anlamlı değil, a; SF ile DS arasında, b; SF ile DD arasında, c; DS ile DD arasında

Grafik 12. Grupların demir ve transferin saturasyonlarının karşılaştırılması



* SF ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$; ** DD ile DS grubu karşılaştırıldığında $p<0,05$

13. TNF- α Sonuçları

Hiçbir grupta TNF- α aktivasyonu saptanamadı. Pozitif kontrollerde kitin çalışmasına rağmen sıçan serum örneklerinde TNF- α düzeyinin saptanamaması bu değerlerin çok düşük olduğunu; kitin saptama sınırının altında kaldığını düşündürmektedir.

13. IL-2 Sonuçları

Gruplarda IL-2 düzeyi saptanamadı. Pozitif kontrollerde kitin çalışmasına rağmen sıçan serum örneklerinde IL-2 düzeyinin saptanamaması bu değerlerin çok düşük olduğunu; kitin saptama sınırının altında kaldığını düşündürmektedir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak toplam lenfosit sayısında demir sükroz ve demir dekstran yüklemesi ile anlamlı değişiklikler saptanmamıştır [75]. Bu çalışma ile demir sükrozun demir dekstrana göre CD4 T lenfositleri 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. Bu yönü ile literatürde ilk çalışmadır.

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 gösterilmiştir [103]. Çalışmamızda demir sükroz grubunda CD4 T lenfositlerin sayısında 3. saatten itibaren düşüş görülmüştür ve bu düşme 24. saat sonunda da devam etmiştir. Demir dekstran ve kontrol grubunda CD4 T lenfositlerde düşme saptanmamıştır. Gupta ve arkadaşlarının yapmış olduğu hemodiyaliz hastalarından alınan hücrelerin kültüründe üç farklı demir preparatını (demir glukonat, demir sükroz ve demir dekstran) karşılaştırdıkları çalışma sonunda her üç demir preparatının da kontrol grubuna göre CD4 T lenfositleri anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada her üç demir preparatı da 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yoğunluğunda uygulandığında demir sükrozun ve demir glukonatın demir dekstran'a göre CD4 T lenfositleri daha fazla baskıladığı görülmüştür. Biz çalışmamızda demir dekstran ile kontrol grubu arasında farklılık saptamadık. Hücre kültüründe kullanılan demir dozu ile çalışmamızda kullanılan demir dozlarının farklılığı ve çalışmamızın in vivo olması bu farklılığa neden olmuş olabilir. Hemodiyaliz hastalarında yürütülen demir sükrozun tek doz 30 ve 100 mg olarak hemodiyaliz seansının sonunda kullanıldığı bir çalışmada demir sükrozun CD11b, CD14, CD36 ve CD45 dağılımı üzerine bir etkisi gösterilememiştir. Bu çalışmada CD4 ve CD8 T lenfositler çalışılmamış ve hemodiyaliz işleminin etkisi göz ardı edilmiştir. Sıçanlarda üç hafta süre ile günlük 1,5 mg/kg demir dekstranın intramusküler uygulandığı bir başka çalışmada ise lenfosit sayısında azalma olduğu gösterilmiştir [39]. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak demir uygulaması intramusküler yapılmış ve üç haftalık bir uygulama

yapılmıştır. Çalışmamızda tek doz uygulanmış olup akut etkileri değerlendirilmiştir.

Sıçanlarda yapılan, in vitro bir çalışmada demir sitrat yüklemesinin CD4/CD8 oranının azalttığı gösterilmiştir. CD4/CD8 oranındaki azalmanın lenfositlerdeki en fazla 12. saatte olduğu 48. saatte ise eski düzeyine geldiği tespit edilmiştir [38]. Bizim çalışmamızda ise demir sükrozun CD4/CD8 oranını 3. saatten itibaren düşürdüğü ve bu düşüşün 6. ve 24. saatlerde giderek arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda demir uygulamalarının 24 saat içindeki etkilerini inceledik. Demir sükroza bağlı değişikliğin demir sitrata göre daha hızlı düzeldiği söylenebilir.

Çalışmamızda demir sükrozun demir dekstran ile karşılaştırıldığında CD8 T lenfositleri arttırdığını gösterdik. Demir yüklemesi ile CD8 T lenfositlerin arttığı talasemili ve hemokromatozisli hastalarda gösterilmiş olup mortalite ile ilişkisi kurulmuştur [103]. Literatürde demir preparatlarını CD8 T lenfositlerine etkisini karşılaştıran başka bir çalışma yoktur; çalışmamız bu nedenle ilk sonuçları vermektedir.

Hücrel ve humoral immünitinin dengeli çalışabilmesi antijen sunan hücrelerle T lenfositlerin etkileşimi zorunludur. APC ile T lenfosit etkileşiminden sonra T lenfositleri aktive olmaktadır. Bu etkileşimin olması için APC yüzeyinde yer alan MHC II gerekli olan moleküllerden bir tanesidir. Çalışmamızda demir sükrozun antijen sunan hücreleri kontrol grubuna göre 6 ve 24. saatte, demir dekstran grubuna göre ise 24. saatte anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir. APC'ler hem DS hem de DD grubunda azalmış olmasına rağmen DS grubunda daha fazla azalmıştır. Demir dekstranın ile kontrol grubu arasında farklılık saptanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda SDBY'li bulunan hastaların hücre kültürü çalışmalarında APC'in MHC II salınımının azaldığı gösterilmiştir ancak buna demir uygulanmasının etkisinin olup olmadığı çalışılmamıştır [26-28]. Hemokromatozisli hastaların hücre kültürü çalışmalarında makrofajlardan MHC II salınımının azaltıldığı gösterilmiştir ancak bu hastalarda böbrek yetmezliği yoktur [45-47]. Çalışmamız böbrek yetmezliği olmayan sağlıklı sıçanlarda yürütülmüş olup demir sükrozun MHC II salınımını azalttığını gösteren ilk çalışmadır.

APC ile etkileşen T lenfositlerin aktive olup çoğalmaları için interlökin 2 ile etkileşmesi gereklidir. Th1 veya Th2 lenfositlerin farklılaşması izler. Th1 lenfositler IFN- γ sentezleyerek CD8 T lenfositleri ve makrofajları aktif hale getirerek EBS'nin

selüler kolunu baskın hale getirir. Th2 lenfositler esas olarak IL-4 sentezleyerek B lenfositleri aktif hale getirerek EBS'nin humoral kolunu aktif hale getirirler [31]. Çalışmamızda demir sükrozun lenfositlerin aktivasyon belirteci olan CD25'i 3. saatten itibaren baskıladığını ve bunun 24. saatte de devam ettiğini gösterdik. Çalışmamızda IL-2 düzeylerini de çalışıp aktive T lenfositlerin baskılanma mekanizması hakkında daha net sonuçlar söyleyebilecektik ancak IL-2 düzeylerini tespit edemedik. Literatürde aktive T lenfositlere demir uygulamasının etkisini inceleyen çalışma yoktur. Aktive T lenfositler çoğunlukla organ nakli immünolojisinde çalışılmış olup dokuda artması doku reddi ile yakından ilişkilidir.

Demir yüklenmesi ile IFN- γ düzeylerinin azaldığını bildiren çalışmalar vardır. Yedi hafta süreyle ağız yoluyla demir yüklemesi (3000 veya 5000 mg/kg/gün) yapılan farelerde INF- γ düzeyinde düşme saptanmıştır. Aynı farelere düşük demir (7 mg/kg/gün) verilmeye başlandıktan sonra da IFN- γ düzeyinde artma olduğu gösterilmiştir [44]. Sağlıklı insanların T helper hücre kültüründe 2, 10 ve 50 μ M demir kloridin doz bağımlı olarak IFN- γ 'yı baskıladığı gösterilmiştir [46]. Başka bir çalışmada sağlıklı insanlardan alınan T helper hücre kültüründe 25 μ M serbest demirin IFN- γ ve MHC II salınımını azalttığı ve Th-1 yanıtını azalttığı gösterilmiştir [45]. Demir yükü olan hemokromatozisli hastalarda da IFN- γ düzeylerinin azaldığı ve IFN- γ aracılı yolakların baskılandığı bildirilmektedir [47]. Çalışmamızda demir sükrozun IFN- γ 'yı baskıladığı gösterilmiştir. IFN- γ düzeyinin CD4 T lenfositlerle beraber düşmüş olması çalışmamızda demir sükrozun daha çok Th-1'leri etkilediğini yansıtmaktadır.

Çalışmamızda demir preparatlarının immünite üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde araştırmak için TNF- α ve IL-2 düzeylerinin de çalışılmasını planlanmıştır. Ancak çalışma gruplarında TNF- α ve IL-2 düzeylerini saptayamadık. Bu TNF- α ve IL-2 değerlerinin kitin saptama sınırının altında olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Serum demir ve transferin saturasyonunu demir sükroz grubunda daha yüksek saptadık. . Pai ve arkadaşları hemodiyaliz hastalarında yapmış oldukları çalışmada demir glukonat ve demir sükrozun demir dekstrana göre daha fazla serbest demir açığa çıkardığını göstermişlerdir [104].

Bu veriler çalışmamızda transferrin saturasyonunun demir sükröz grubunda demir dekstran ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmasını açıklayabilir.

Çalışmada demir sükrözün B lenfositlerin sayısını 6. saatte azalttığını belirledik. HD hastalarında B lenfosit sayısında azalabileceğini ancak işlevlerinde azalma olmadığını bildiren çalışmada demirin etkisi incelenmemiştir [68]. Bu konuda fazla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda demir sükröz ile demir dekstran'ın lenfosit dağılımlarına farklı etkilerinin molekül yapılarının farklılığından kaynaklandığını düşünüyoruz. İntravenöz demir preparatları demir-oksihidroksit jel içeren bir çekirdek ve bu çekirdeği kaplayan ve molekülün stabilizeşmesine yarayan karbohidrat bir kılıftan oluşmaktadır. Bu kılıf biyoaktif demirin yavaş salınarak hastalar tarafından kolay tolere edilebilmesini sağlamaktadır. Demir preparatları arasındaki temel farklılık 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 [49]. Demir dekstran demir sükröze göre daha büyük çekirdeğe ve kılıfa sahiptir. Demir dekstran demir sükröze göre serbest demir oluşturma hızı daha az, transferini doyurma zamanı ve plazma yarı ömrü daha uzundur.

Bu veriler küçük moleküler ağırlıklı (demir sükröz gibi) demir preparatlarının daha fazla toksik etkilerinin olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak demir sükröz CD4⁺ T lenfositleri, CD4/CD8 oranını, aktive T lenfositleri, antijen sunan hücrelerdeki MHC II düzeyini, B lenfositleri ve IFN- γ düzeyini baskılamıştır. Aynı etkileri demir dekstran göstermemiştir.

Bu bulgular ışığında demir sükrözün demir dekstranla karşılaştırıldığında periferik kanda lenfosit dağılımı ve işlevleri üzerine daha fazla olumsuz etkilerinin olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışma sağlıklı ratlarda yürütüldüğü için böbrek yetmezliği olanlara sonuçlar genellenemez. Çalışmada 10 mg/kg eş değer dozda demir sükröz ve demir dekstran tek doz olarak uygulanmıştır ve akut etkisi test edilmiştir; sonuçlar

uzun dönemde aynı olmayabilir. Diyaliz hastaları tekrarlayan ve bir seferde daha düşük dozlar almaktadırlar. Çalışmamızda lenfosit dağılımı sadece periferik kanda çalışılmıştır dokulardaki dağılımı farklı olabilir. Bu nedenle ileride yapılacak birçok çalışma ile bu sorulara da yanıtlar bulunabilir.

KAYNAKLAR

1. Brideau RJ, C.P., McMaster WR, Williams AF, Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*, 1980. **10**: p. 609-615.
2. Jefferies WA, G.J., Williams AF, Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J Exp Med*, 1985. **162**: p. 117-127.
3. Torres-Nagel N, K.E., Brown MH, Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(11): p. 2841-2848.
4. McMaster WR, W.A., identification of Ia glycoprotein's in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol*, 1979. **9**: p. 426-433.
5. Fukumoto T, M.W., Williams AF, Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus. *Eur J Immunol*, 1982. **12**: p. 237-243.
6. Woollett GR, B.A., Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1985. **15**: p. 165-173.
7. Bezouska K, V.G., Horwath O, Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem*, 1994. **299**(24): p. 16945-52.
8. Tamatani T, K.F., Kuida K, Characterization of rat LECAM-1 (L-selectin) by the use of monoclonal antibodies and evidence for the presence of soluble LECAM-1 in rat sera. . *Eur J Immunol*, 1993. **23**(9): p. 2181-2188.
9. www.tsn.org.tr, Registry of the nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. 2009.
10. Vanholder R, R.S., Dhondt A, Hakim R, Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross sectional study. *Kidney Int* 1991. **39**: p. 320-327.
11. Haag-Weber M, H.W., Uremia and infection: mechanisms of impaired cellular host defense. *Nephron* 1993. **63**: p. 125-131.
12. Lewis SL, V.E.D., Chenoweth DE, Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin Nephrol* 1998. **30**: p. 63-72.
13. Steketee RW, Z.M., Davis JP, Seroresponse to hepatitis B vaccine in patients and staff of renal dialysis centers, Wisconsin. *Am J Epidemiol* 1988. **127**: p. 772-782.
14. de Graeff PA, D.J., de Zeeuw D, Gips CH, van der Hem GK, Immune response to two different hepatitis B vaccines in haemodialysis patients: a 2-year follow-up. *Nephron*, 1985. **40**: p. 155-160.
15. Kohler H, A.W., Renschin G, Dormeyer HH, Meyer zum Buschenfelde KH, Active hepatitis B vaccination of dialysis patients and medical staff. *Kidney Int* 1984. **25**: p. 124-128.
16. Stevens CE, A.H., Taylor PE, Zang EA, Harley EJ, Szmuness W, Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis. Immunogenicity and efficacy. *N Engl J Med* 1984. **311**: p. 496-501.

17. Rautenberg P, T.I., Schlegelberger T, Ullmann U, Influenza subtypespecific IgA, IgM and IgG responses in patients on hemodialysis after influenza vaccination. *Infection* 1988 **16**: p. 323–328.
18. Girndt M, P.M., Kohler H, Tetanus immunization and its association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1995. **26**: p. 454–460.
19. Kreft B, K.M., Kreft R, Kirchner H, Sack K, Low efficiency of active immunization against diphtheria in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997. **52**: p. 212–216.
20. Chia S, K.M., Elwood RK, Fitz Gerald JM, Risk of tuberculosis in dialysis patients: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998. **2**: p. 989–991.
21. Simon TA, P.S., Wartenberg D, Tokars JI, Tuberculosis in hemodialysis patients in New Jersey: a state wide study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999. **20**: p. 607–609.
22. Chou KJ, F.H., Bai KJ, Hwang SJ, Yang WC, Chung HM, Tuberculosis in maintenance dialysis patients. *Nephron* 2001. **88**: p. 138–143.
23. Malik GH, A.-H.A., Al-Mohaya S, Al-Khawajah H, Kechrid M, Al Hassan AO, Balbaid K, Shetia MS, Eleven years of experience with dialysis associated tuberculosis. *Clin Nephrol* 2002. **58**: p. 356–362.
24. Woeltje KF, M.A., Rothstein M, Seiler S, Fraser VJ, Tuberculosis infection and anergy in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998. **31**: p. 848–852.
25. Meuer SC, H.M., Kurz P, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H, Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses. *J Clin Invest* 1997. **80**: p. 743–749.
26. Stachowski J, P.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**: p. 369–375.
27. Stachowski J, P.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**: p. 171–177.
28. Stachowski J, P.M., Burth C, Maciejewski J, Baldamus CA, Nonresponsiveness to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: association with impaired TCR/CD3 antigen receptor expression co-stimulatory processes in antigen presentation and recognition. *Nephrol Dial Transplant* 1994. **9**: p. 144–152.
29. Lenschow DJ, W.T., Bluestone JA, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 233–258.
30. Girndt M, K.H., Schiedhelm-Weick E, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B, T cell activation defect in hemodialysis patients: evidence for a role of the B7/CD28 pathway. *Kidney Int*, 1993. **44**: p. 359–365.
31. Swain SL, B.L., Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg AD, Duncan DD, Hedrick SM, Dutton RW, Huston G, Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in their development *Immunol Rev*, 1991. **123**: p. 115–144.

32. Gerez L, M.L., Shkolnik T, Kristal B, Arad G, Reshef A, Steinberger A, Ketzinel M, Sayar D, Shasha S, Kaempfer R, Regulation of interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in renal failure. *Kidney Int* 1991. **40**: p. 266–272.
33. Daichou Y, K.S., Hashimoto S, Suzuki S, Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. *Nephron* 1999. **83**: p. 237–245.
34. Collins AJ, L.S., St Peter W, Ebben J, Roberts T, Ma JZ, Manning W, Death, hospitalization, and economic associations among incident hemodialysis patients with hematocrit values of 36–39%. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**: p. 2465-2473.
35. Farrar JD, A.H., Murphy KM, T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest*, 2002. **109**(4): p. 431-435.
36. Mencacci A, C.E., Boelaert JR, Iron overload alters innate and T helper cell responses to *Candida albicans* in mice. *J Infect Dis*, 1997. **175**(6): p. 1467–1476.
37. Weiss G, T.P., Mabeza G, Modulatory potential of iron chelation therapy on nitric oxide formation in cerebral malaria. *J Infect Dis*, 1997. **175**(1): p. 226–230.
38. de Sousa M, R.R., Porto G, Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*, 1991. **58**: p. 171-177.
39. Cardier JE, R.E., Soyano A, T lymphocytes subsets in experimental iron overload. *Immunopharmacol Immunitoxicol*, 1997. **19**: p. 75-87.
40. G, W., Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32**(1): p. 70-78.
41. Kontoghiorghes GJ, W.E., Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. *Blood Rev*, 1995. **9**(1): p. 33-45.
42. Dlaska M, W.G., Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 6171–6177.
43. C, B., Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2001. **2**(10): p. 907-916.
44. Omara F, B.B., The effect of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *British Journal of Nutrition*, 1994. **72**: p. 899-909.
45. Weiss G, F.D., Hausen A, Iron modulates interferon-gamma effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol*, 1992. **20**(5): p. 605-610.
46. Oexle H, K.A., Most J, Pathways for the regulation of interferon-gamma-inducible genes by iron in human monocytic cells. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(2): p. 287-294.
47. Recalcati S, P.R., Levi S Response of monocyte iron regulatory protein activity to inflammation: abnormal behavior in genetic hemochromatosis. *Blood* 1998. **91**(7): p. 2565–2572.
48. Walker EM Jr, W.S., Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci*, 2000. **30**: p. 354–365.
49. BG, D., Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(2): p. 93-98.

50. Guz G, G.G., 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**: p. 2834–2840.
51. Gupta A, Z.J., Zha J, Reddy S, Olp J, Pai A, Effect of different intravenous iron preparations on lymphocyte intracellular reactive oxygen species generation and subpopulation survival. *BMC Nephrology*, 2010: p. 11-16.
52. van Dijk PC, J.K., de Charro F, Collart F, Cornet R, Dekker FW, Gronhagen-Riska C, Kramar R, Leivestad T, Simpson K, Briggs JD, ERA-EDTA registry. Renal replacement therapy in Europe: the results of a collaborative effort by the ERA-EDTA registry and six national or regional registries. *Nephrol Dial Transplant* 2001. **16**: p. 1120–1129.
53. Sarnak M, j.B., Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the normal population. *Kidney Int* 2000. **58**: p. 1758–1764.
54. Satomura A, E.M., Ohi H, Sudo S, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M, Fujita T, Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure. *Nephron*, 2002. **92**: p. 702-704.
55. Satomura A, E.M., Fujita T, Ohi H, Ohsawa I, Fuke Y, Matsumoto K, Sudo S, Matsushita M, Fujita T: , Serum mannose-binding lectin levels in maintenance hemodialysis patients: impact on all-cause mortality. *Nephron Clin Pract* 2006. **102**: p. 93-96.
56. Ando M, L.I., Bergstrom J, Lindholm B, Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int* 1996. **49**: p. 773-780.
57. Ando M, G.M., Bergstrom J, Lindholm B, Lundkvist I, Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int* 1997. **51**: p. 785-792.
58. Chmielewski M, B.E., Marzec L, Aleksandrowicz E, Witkowski JM, Rutkowski B, Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients. *Artif Organs*, 2005. **29**.
59. Ando M, S.A., Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K, Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. *Kidney Int*, 2006. **70**: p. 358-362.
60. Kuroki Y, T.K., Go I, Aoyama M, Naganuma T, Takemoto Y, Nakatani T, A study of innate immunity in patients with end-stage renal disease: special reference to toll-like receptor-2 and -4 expression in peripheral blood monocytes of hemodialysis patients. *Int J Mol Med*, 2007. **19**: p. 183-790.
61. Ando M, S.A., Yasuda M, Azuma N, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K, Impairment of innate cellular response to in vitro stimuli in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005. **20**: p. 2497-2503.

62. Anding K, G.P., Rost JM, Allgaier D, Jacobs E, The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**.
63. KL, A.S., Cruz I, Yanovski JA, Weis JH, Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 1998. **54: 236–244, 1998** p. 236-244.
64. Stenvinkel P, K.M., Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits- Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M, IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005. **67**: p. 1216-1233.
65. Jr, O.K., Clinical importance of biocompatibility and its effect on haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**: p. 41-44.
66. Meuer SC, H.M., Kurz P, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H, Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses. *J Clin Invest*, 1987. **80**: p. 743-749.
67. Stachowski J, P.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**: p. 369-375.
68. Fernandez-Fresnedo G, R.M., Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, Lopez-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**: p. 502–510.
69. RH, Z., Antigens, T dependent and independent. In: Delves PJ, Roitt IM (eds). *Encyclopedia of Immunology*, Vol. 1, 2nd edn. London: Academic Press, 1998: p. 214–218.
70. Biancone L, C.V., Camussi G, CD40–CD154 interaction in experimental and human disease. *Int J Mol Med* 1999. **3**: p. 343–353.
71. Friedman EA, B.M., Hirsch SR, Schiffman G, Intact antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides in uremia and diabetes. *JAMA* 1980. **244**: p. 2310–2311.
72. J, R., Efficacy of pneumococcal immunization in patients with renal disease—what is the data? *Am J Nephrol* 2004. **24**: p. 402–409.
73. Okasha K, S.A., el Bedowey MM, Shoker AS, Immunoglobulin G subclasses and susceptibility to allosensitization in humans. *Clin Nephrol* 1997. **48**: p. 165–172.
74. Newport MJ, H.C., Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M, A mutation in the interferon-gamma-receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996. **26**: p. 1941–1949.
75. Deenitchina SS, A.T., Okuda S, Kinukawa N, Hirakata H, Nagashima A, Fujishima M, Cellular immunity in hemodialysis patients: a quantitative analysis of immune cell subsets by flow cytometry. *Am J Nephrol* 1995. **15**: p. 57–65.
76. ML, D., Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J Clin Immunol*, 2001. **21** p. 258–263.

77. Lee KH, D.A., Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS, The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*, 2003. **302**: p. 1218–1222.
78. Lin J, M.M., Shaw AS, The c-SMAC: sorting it all out (or in). *J Cell Biol*, 2005. **170**: p. 177–182.
79. Sester U, S.M., Hauk M, Kaul H, Kohler H, Girndt M, T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000. **15**: p. 1217–1223.
80. Heine G, S.U., Sester M, Scherberich JE, Girndt M, Kohler H, A shift in the Th(1)/Th(2) ratio accompanies the clinical remission of systemic lupus erythematosus in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17**: p. 1790–1794.
81. Hsieh CS, M.S., Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM, Development of TH1 CD4 + T cells through IL-12 produced by Listeria induced macrophages. *Science*, 1993. **260**: p. 547–549.
82. Seder RA, G.R., Sher A, Paul WE, Interleukin 12 acts directly on CD4 + T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. **90**: p. 10188–10192.
83. Schindler R, L.S., Schulze M, Oppermann M, Dinarello CA, Shaldon S, Koch KM Gene expression of interleukin-1 beta during hemodialysis. *Kidney Int*, 1993. **43**: p. 712–721.
84. Girndt M, K.H., Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Buschenfelde KH, and F. B, Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1995. **47**(559–565).
85. Carracedo J, R.R., Soriano S, Alvarez de Lara MA, Rodriguez M, Martin-Malo A, Aljama P, Monocytes from dialysis patients exhibit characteristics of senescent cells: does it really mean inflammation? . *Contrib Nephrol*, 2005. **149**: p. 208–218.
86. Brunet P, C.C., Dellacasagrande J, Thirion X, Mege JL, Berland Y, IL-10 synthesis and secretion by peripheral bloodmononuclear cells in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 1998. **13**: p. 1745–1751.
87. Groux H, O.G.A., Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG, A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997. **389**: p. 737–742.
88. Meier P, D.E., Blanc E, Wauters JP, Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002. **13**: p. 204–212.
89. Eleftheriadis T, A.G., Liakopoulos V, Kartsiosis C, Stefanidis I, Disturbance of acquired immunity in hemodialysis patients. *Seminars in Dialysis* 2007. **20**(5): p. 440-451.

90. JH, B., The effect of iron and transferrin on the response of serum-free cultures of mouse lymphocytes to concanavalin A and lipopolysaccharide. *Immunology*, 1981. **43**(2): p. 387-392.
91. Latunde-Dada GO, Y.S., Iron deficiency and immune responses. *Scand J Immunol Suppl*, 1992. **11**: p. 207-209.
92. Theurl I, Z.H., Obrist P, Iron regulates hepatitis C virus translation via stimulation of expression of translation initiation factor 3. *J Infect Dis*, 2004. **190**(4): p. 819–825.
93. VR, G., African iron overload. *Semin Hematol* 2002. **39**(4): p. 263-269.
94. Gordeuk VR, D.J., Langlois MR, Boelaert JR, Iron status and the outcome of HIV infection: an overview. *J Clin Virol* 2001. **20**(3): p. 111–115.
95. Patruta SI, E.R., Sunder-Plassmann G, Horl WH, Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(4): p. 655–663.
96. Guo D, J.B., Lee S, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ, Balakrishnan VS, Impact of iron dextran on polymorphonuclear cell function among hemodialysis patients. *Clin Nephrol*, 2002. **58**: p. 134-142.
97. Williams P, G.E., Bacterial transferrin receptors—structure, function and contribution to virulence. *Med Microbiol Immunol* 1992. **181**: p. 301–322.
98. S, F., Review of issues relating to iron and infection. *Am J Kidney Dis*, 1999. **34**: p. 47-52.
99. Seifert A, v.H.D., Schaefer K, Iron overload, but not treatment with desferrioxamine favours the development of septicemia in patients on maintenance hemodialysis. *Q J Med*, 1987. **65**: p. 1015–1024.
100. Tielemans CL, L.C., Wens R, Collart FE, Dratwa M, Critical role of iron overload in the increased susceptibility of haemodialysis patients to bacterial infections. Beneficial effects of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant* 1989. **4**: p. 883–887.
101. Hoen B, K.M., Hestin D, Mayeux D, Risk factors for bacterial infections in chronic haemodialysis adult patients a multicentre prospective survey. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10**: p. 377–381.
102. Canziani ME, Y.S., Rangel EB, Manfredi SR, Neto MC, Draibe SA, Risk of bacterial infection in patients under intravenous iron therapy: dose versus length of treatment. *Artif Organs*, 2001. **25**: p. 866–869.
103. Djeha A, B.J., Uptake and intracellular handling of iron from transferrin and iron chelates by mitogen stimulated mouse lymphocytes. *Biochem Biophys Acta*, 1992. **1133**: p. 147-152.
104. Pai AB, H.A., Boyd AV Comparison of oxidative stress markers in hemodialysis patients following administration of iron dextran, sodium ferric gluconate and iron sucrose. *Pharmacotherapy*, 2007. **27**: p. 343-350.