

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Biofizik Bilim Dalı

80537

TAVŞANDA ARALIKLI KRONİK HİPOKSİK
HİPOKSİ İLE OLUŞTURULAN POLİSİTEMİDE ERİTROPOEZ VE
ESER ELEMENTLERİN İNCELENMESİ

BİOFİZİK DOKTORA TEZİ
(M. Sc. Dr.)

T 80537

B. Barutçu

Ü. Bora BARUTÇU


**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İSTANBUL - 1985

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1- Hipoksi ve Eritropoez İlişkileri.....	4
2- Eritropoietinin Kimyasal Yapısı ve Salgılan- ması.....	5
3- Eser Elementler.....	7
a- Demir.....	7
b- Bakır.....	12
c- Çinko.....	15
ARAŞTIRMANIN AMACI.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
BULGULAR	32
TARTIŞMA.....	41
ÖZET	49
SUMMARY.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	53
TEŞEKKÜR	54
KAYNAKLAR	55

SEMBOLLER

- M.C.V. : Tek eritrosit ortalama hacmi
M.C.H. : Tek eritrosit ortalama hemoglobin değeri
M.C.H.C. : Eritrosit ortalama hemoglobin konsantrasyonu
T.I.B.C. : Total demir bağlama kapasitesi
% Tr.S. : % transferrin satürasyonu
C : Konsantrasyon
A : Absorbans
p.p.m. : $\mu\text{g}/100 \text{ ml.}$
- 

G İ R İ Ş

Organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan en önemli dokulardan biri kan dokusudur. Bu doku, plazma sıvısı içinde süspansiyon halinde bulunan hücrelerden oluşur. Hücresel elementlerin (eritrosit, lökosit, trombosit), yaşlanmaları veya aşırı fonksiyonel aktivite göstermelerinin bir sonucu olarak yıkıma uğradıkları bilinir. Bu nedenle, hücrelerin yıkımı ile yapımı arasında uygun bir denge vardır. Günlük fizyolojik koşullarda çeşitli hücre tiplerinde önemli değişiklikler gözlenmez (23).

Bu olayın gerçekleşmesinde özel hormonlar, uyarıcı faktörler ve hemolitik yıkım ürünleri önemli etkenler olarak kabul edilirler. Örneğin; kan ve dokular düzeyinde PO_2 'nin azalması sonucunda, kemik iliğinin uyarıldığı ve eritropoez olayının hızlandığı bilinir. Uyarıcı faktörler genellikle eritropoietin adı verilen bir hormonun salgılanmasını arttırmakta, kemik iliği bu hormonun aracılığı ile fonksiyon göstermektedir (23).

Kanın diğer hücresel elementlerinin oluşumunda da eritropoietine benzer "poietin" hormonlarının etkisinden bahsedilmektedir (97). Ayrıca, kemik iliğinin hemopoietik fonksiyonunu normal olarak sürdürebilmesi, yeterli düzeyde hemopoietik maddelerin varlığını gerektirir. Bu maddeler, ya hücrenin yapı taşına girerler ya da biyolojik olayları aktive eden enzim veya koenzimlerin fonksiyon görmesinde rol oynarlar.

Çalışmamızda konu edilecek olan eser elementlerin, özellikle enzim sistemindeki yeri çok önemlidir. Örneğin;

eritrositlerin yüksek düzeyde CO₂ taşımaya neden olan karbonik anhidraz enziminin yapısında Zn⁺⁺ (Çinko) iyonu bulunur. Hücre düzeyinde hidrojen peroksidi su ve oksijene çözümlenerek, hücrenin korunmasında yardımcı olan katalaz enzimin yapısında Fe⁺⁺ (Demir) yer alır. Mitokondrilerde sitokrom enzimlerinin yapısında bulunan Cu⁺⁺ (Bakır), O₂ taşınmasında önemli role sahiptir. Bu enzimin aktivasyonu, hücrenin enerji metabolizmasında anahtar reaksiyonu görür (65). Bu ve benzer pek çok örnekle açıklanabileceği gibi, eser elementlerin hemopoietik sistemdeki önemini incelemek üzere çalışmamız planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Fizyolojik koşullarda eritrositlerin dolaşım sistemindeki toplam miktarı oldukça dar sınırlar arasında bulunur. Bu miktar dokuların oksijenlenmesi için yeterli olup, dolaşımı engelleyecek derecede arttırılmaz. Herhangi bir nedenle, dokulara iletilen oksijen miktarı azalacak olursa, eritrosit yapımı artar. Örneğin, kanama veya başka bir nedenle belirgin bir kansızlığa (anemiye) düşüldüğünde, kemik iliğinde eritrosit üretimi başlar ve organizmanın O_2 gereksinmesinin karşılanmasına çalışılır (36).

Aynı şekilde, deniz düzeyinden yükseklere çıkıldığında havadaki oksijenin parsiyel basıncının (PO_2) azalması nedeniyle, dokulara taşınabilen oksijen miktarı da azalır. Bu durumda eritrosit üretimi hızlandırılarak, kandaki miktarı arttırılır. Şu halde, eritrosit üretimini ayarlayan etken kandaki eritrosit sayısı olmayıp, gerçekte bu hücrelerin fonksiyonel güçleri, yani oksijen gereksinmesi olan dokulara taşınabilen oksijen miktarıdır (36).

Arteriyel kanda ve dokularda PO_2 'nin azalması anlamalarına gelen hipoksemi ve hipoksi, çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilir. Bu nedenler: 1) Solunan havada ve dolayısıyla kanda oksijenin parsiyel basıncının azalması, hipoksik hipoksi; 2) kandaki hemoglobin konsantrasyonu veya eritrosit sayısında azalma sonucunda O_2 taşıma kapasitesinin düşmesi, anemik hipoksi; 3) dokularda kan akımının yavaşlaması, durgun hipoksi; 4) dokularda, O_2 kullanımının engellenmesi nedeniyle, birim zamanda yeterli O_2 'nin taşınmaması, histotoksik hipoksi olarak isimlendirilir (89).

Hipoksi ve Eritropoez İlişkileri

Hipoksi veya anoksinin eritropoez mekanizmasını stimule ettiği görüşü yaklaşık yüzyıl önce Paul Bert (7) tarafından ortaya atılmış ve o tarihten bu yana bu görüşü destekleyen sayısız araştırmalar yapılmıştır (9, 73, 76, 87, 90).

Paul Bert yüksekliğe adaptasyonun, yani aklimatizasyonun, kandaki eritrosit sayısı artmasıyla sağlandığını ileri sürmüştür. Bu amaçla, And dağlarında yaşayan insan ve hayvanlardan alınan kan örneklerinin oksijen kapasitesi, deniz düzeyinde yaşayan insan ve hayvanlarınkine karşılaştırılmış; yükseklerde yaşayanlarda kanın oksijen taşıma kapasitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. O₂ taşıma kapasitesindeki artışın gerçek nedeni, kanda hemoglobin konsantrasyonunun artması ile açıklanır (7).

1890 yılında Viault (96), yüksekliğin eritrositler üzerine etkisini 4540 m. yükseklikte yaşayan insanlarda incelemiş ve bu gibi kişilerde farklı derecelerde polisitemi saptamıştır. Yükseklikte düşük basıncın eritrosit yapımını nasıl etkilediğine dair çalışmalar, önceleri Barcroft (4), Talbott ve Dill (85), Lawrence (49) ve daha sonra da Hurtado et al. (42) ile Monge (54) tarafından Peru'da And dağlarında (5000 m.) yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda, yükseklik düzeyi, yani hipoksi derinliği ile polisiteminin derecesi arasında çok anlamlı bir ilişkinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Önceleri hipoksinin kemik iliğini direkt olarak stimule ettiği zannedilmiş; ancak Carnot ve Deflandre (13)'ün 1906'da yayımladığı araştırmaları sonucunda bu stimülasyonun hümorale bir madde aracılığı ile olduğu ileri sürülmüştür.

Carnot ve Deflandre, anemik kişilerin plazmasında bulunan ve bu tür plazma örnekleri ile injekte edilen hayvanlarda eritropoezi hızlandıran bu humoral maddeye "hemopoietin" adını vermişlerdir (13). Daha sonraları bu humoral maddenin kemik iliğinde yalnız eritropoezi hızlandırdığı saptanmış bu nedenle madde Bonsdorff ve Jalavisto (8) tarafından "eritropoietin" diye adlandırılmıştır.

Reynafarje (73), And dağlarında Morococha'da 4540 m. yükseklikte yaşayan insanlarda yaptığı çalışmalarda, eritropoietik aktiviteyi belirlemek amacıyla kan hacmi, % retikülozit değeri, demir metabolizması ve kemik iliği sitolojisini incelemiş; elde ettiği bulguları deniz düzeyinde yaşayan sağlıklı kişilerin benzer parametreleri ile karşılaştırmıştır. Belirtilen kan parametrelerinde, yüksekliğe çıktığında bir artma, kemik iliğinde hiperplazi ve tekrar deniz düzeyine inildiğinde ise, bir azalmanın olduğu saptanmıştır.

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, hipoksik koşullarda eritropoezin hızlanmasında kandaki eritropoietin düzeyinin önemli bir etken olduğu anlaşılmıştır (31,43). Şu halde, hipoksik uyarıgerçekte direkt olarak kemik iliğini etkilemez; eritropoietin yapımını arttırır. Nitekim, deneysel olarak, organ ve dokularda damarların daraltılması ile meydana getirilen durgun hipokside, eritropoietin yapımının arttığı gözlenmiştir (20,44). Yine, Mylera ve Abbrecht (57) ve Stohlman ve Brecher (80) kronik hipoksiye maruz bırakılan deney hayvanlarında, eritropoietin yapımının hipoksinin şiddetine bağlı olduğunu göstermişlerdir (21).

Eritropoietin Kimyasal Yapısı ve Salgılanması

Eritropoez mekanizmasının düzenlenmesinde çok önemli bir yeri olan eritropoietin hormonu plazmanın alfa-1 globulin fraksiyonunda yer alan bir glikoproteindir (23,89). Eritropoietin, insan plazma ve idrarından yüksek saflıkta elde edilmiştir. Plazmadan elde edilen eritropoietin, proteinin

mg.'ı başına 8250 ünite; idrardan elde edilen ise 8086 ünite içermektedir. Molekül ağırlığı 46.000 ve sedimentasyon sabitesi 5-6 S'dir. %26 karbonhidrat ve %74 proteinden yapılmış olan eritropoietin %11 oranında siyalik asit içerir. Isıya ve asite dayanıklıdır. Aktivitesi için siyalik asit gereklidir. Siyalik asit, siyalidase (İng.:Neurinamidase) enzimi ile molekülden ayrılır ve bu suretle inaktif duruma geçer. Maddenin karaciğerde toplanması inaktivasyonunu artırır. Aktivitesi Anti-Ep antikorlarla nötralize edilir(91).

Eritropoietinin özellikle böbrekten salgılandığı uzun zamandan beri bilinmektedir (86).

Böbrek dokusunda oksijene duyar hücrelerin yaygın halde bulunduğu ve bu hücrelerden serbestleyen maddenin inaktif olduğu belirtilmiştir. Renal Eritropoietik Faktör (REF) veya Eritrogenin (Eg) denilen bu inaktif madde, böbrek hücrelerinin mitokondri ve mikrosom fraksiyonlarından elde edilmiştir. Aktif Eritropoietine genel olarak Eritropoietik Stimulan Faktör (ESF) de denilmektedir. Eritrogenin (REF) plazmada ya bir taşıyıcı ile birleşerek ya da enzimatik bir etki sonucunda aktif hale geçer ve aktif eritropoietin (ESF) oluşur (20,44,89).

Hipoksiye tabi tutulan nefrektomize hayvanlardan elde edilen karaciğer ve dalak homojenatlarında veya bu organlarda perfüze edilen kan plazmasında ESF miktarlarının artmış olduğu gözlenmiştir (58).

Çeşitli araştırmalarla da anlaşıldığı gibi, Ep hormonu yalnız böbreklerden salgılanmayıp (46), özellikle hipoksik koşullarda karaciğer, dalak ve glomus caroticum gibi ekstrarenal dokularda da sentez edilir (7). Ekstrarenal kaynaklı eritropoietinin özellikle fetal hayatta ve derin anemilerde çok önemli olduğu ileri sürülmektedir (103).

Eser Elementler

Canlı dokularda çok az miktarlarda bulunan, ancak bilinen metodlarla ölçülemeyen elementler için ilk öncele-ri eser veya iz sözcükleri kullanılmış; ancak sonradan eser element terimi ortaya atılmıştır (12). Eser terimi, genel-likle bileşimindeki miktarı 100 ppm.'den fazla olmayan mad-der için kullanılır ve şu alt sınıflara ayrılır

Eser (10⁻² - 10⁻⁴ ppm.),
Micro-eser (10⁻⁴ - 10⁻⁷ ppm.),
Nano-eser (10⁻⁷ - 10⁻¹⁰ ppm.), ve
Pico-eser (10⁻¹⁰ - 10⁻¹³ ppm.) (47).

Organizmada bulunan eser (12,65) elementlerden 10'u önemli eser elementler grubunu oluşturur: demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn) mangenez (Mn), iyod (I), kobalt (Co), molibden (Mo), kalay (Sn), selenyum (Se), krom (Cr).

Demir

Demirden, ilk kez 10. yüzyılda İbni Sina tarafından hazırlanmış olan bir tıbbi ansiklopedide söz edilmiştir. 17. yüzyılda klorosis'in (İng.:Chlorosis) tedavisin -de demirin rolü olduğu bildirilmiş; ancak ilk kez 1938'de kullanılabilir hale gelmiştir. Radioisotopların elde edil-mesinden sonra demir metabolizması etraflı olarak incelen-miştir.

Demirin Organizmada En Önemli Kullanım Yerleri

A. Gerek yaşam için gerekli önemli enzimlerin yapı-sında, gerekse koenzim görevi olan enzimlerde demir önem-li bir yere sahiptir. Örneğin; demirin krebs siklüsünde çok önemli bir rolü vardır. Bu siklüste bulunan enzimlerden 24'-ünde demir, molekülün aktif bir parçası veya Ko-faktörü ola-rak görev alır.

Yapısında demir içeren enzimler başlıca üç grupta toplanabilirler:

1- Demir-porfirin kompleksi taşıyanlar: Sitokrom a, b, c, c₁, a₃; sitokrom c oksidaz, lipoksidaz, katalaz, triptofan, pirrolaz ve peroksidazlar.

2- Demir flavo-protein kompleksi taşıyanlar: Sitokrom c redüktaz, süksinat dehidrogenaz, açıl (Acyl) Co-A dehidrogenaz, NADH dehidrogenaz, ksantin oksidaz ve benzerleri gibi.

3- Ko-faktör karakteri gösteren enzimler: Akonitaz ve süksinat dehidrogenaz gibi enzimlerdir.

Nitekim, vücutta bulunan total demir miktarındaki değişikliklerin, özellikle demir enzimlerinin aktivitelerini önemli derecelerde etkilediği gösterilmiştir(65).

B. Demir, vücut sıvılarındaki gazların iletiminde görevli yapıların bileşimine girer. Bu görevle yükümlü başlıca yapılar şunlardır:

1- Hemoglobin: Total vücut demirinin yaklaşık %60-70'ini içerir ki, toplam miktar, 1.5-3 g. arasında bulunur (23). 68.000 molekül ağırlığında olup yapısında %0.34 oranında demir vardır (36,100). Hemoglobinin dört proto-porfirin kompleksine (hem) bağlı 4 globin molekülünden oluşan hemoglobinin kandaki görevi O₂ ve CO₂ gazlarını taşımak ve kanın reaksiyonunu düzenlemektir (81).

2- Miyoglobin: Hemoglobin gibi bir kromoproteid olan bu madde, özellikle çizgili kaslarda bulunur (36). Molekül ağırlığı yaklaşık 17.000 olup, yalnız bir molekül oksijen bağlayabilir (36,100). Kasların kasılma sırasında, kan akımı yavaşladığından, gerekli olan oksijen miyoglobinden sağlanır. Kasların kontraksiyonunun sona ermesiyle beraber,

damarlar genişler, kan akımı hızlanır ve oksijen miyoglobine bağlanır (100). Bu suretle mitokondrilerin oksidatif reaksiyonları için gerekli olan oksijen, miyoglobinden sağlanmış olur (32). Miyoglobinde ve enzimlerdeki total demir miktarı yaklaşık 300 mg.'dır (23).

3- Ferrodoksin: Basit demir proteini olup fotosentez yapan tüm hücrelerde, genellikle kloroplastlarla birlikte bulunur (65).

Normal bir yetişkinde, total vücut demiri cinsiyete, yaşa ve vücut ağırlığına bağlı olarak 3-5 g. arasında değişir (23,39). Vücuttaki dağılımı ise, kısaca şöyle özetlenebilir: Karaciğer ve dalakta en yüksek; böbrek, kalp, çizgili kaslar, pankreas ve beyinde daha az olarak bulunur. Bu organlardaki toplam miktar dalaktaki konsantrasyonunun 1/20'si kadardır (65).

Demir (Fe) ayrıca organizmada plazmada ve ilgili dokularda depo demiri halinde bulunur.

Plazma demiri: 3-4 mg. kadar olan bu demir, tranferrin veya siderofilin diye isimlendirilen bir β -globine bağlı olarak taşınır. Her bir molekül tranferrin, iki atom demir(Fe^{++}) iyonu bağlar (39).

Normallerde plazma veya serum demiri 120 μ g/100 ml. civarındadır. Demir bağlama kapasitesi diye adlandırılan transferrinin miktarı ise (300-360 μ g/100 ml.) kadardır (39).

Depo veya doku demiri: Depolanan doku demiri yaklaşık 1-1.5 g. arasında olup, ferritin ve hemosiderin adları altında iki formda bulunur (39).

Alınan demirin fazlası, özellikle karaciğerde olmak üzere, dalak, kemik iliği ve çizgili kaslarda depolanır. Depo demirin %60'ı karaciğerde bulunur. Bu fazlalık önce apoferritinle birleşir ve ferritin olarak hücre içinde

depolanır. Ferritin suda kolayca çözünebilen bir depo demiridir. İki alt tipinden biri karaciğer ve dalakta bazik izoferritin, diğeri ise kalp ve bazı tümörlerde asidik izoferritin halinde bulunur (16,69).

Alınan demir, apoferritinin depolayacağından daha fazla miktarda olursa, suda çözünmeyen bir bileşik olan hemosiderin şeklinde depolanır (16). Hemosiderin hücrede vesiküller içinde saklanır (92).

Demirin Emilimi.- Çeşitli besinler, değişik miktarlarda demir içerirler. Ancak, bu besinlerde bulunan demir (Fe^{+++}) ferrik yapıdadır ve emilimde rol oynayan etkenlerden biri de (+) yüklerin çokluğudur (16,36). Bu nedenle ferröz (Fe^{++}) yapıdaki demir bileşiklerinin emilimi daha hızlı olur. Ferrik yapıdaki demir bileşikleri mideye geldiklerinde, midedeki HCL asidi ve diğer organik asidlerin etkileri ile ferröz hale redüklenir. Demirin emilimi ince barsağın üst kısımlarından ve özellikle duodenumda olur.

Önceleri demir emiliminin vücudun gereksinimi ile kontrol edildiği zannedilmiş, fakat sonradan Hahn et al. (38) tarafından "mukozal blok" teorisi ortaya atılmıştır. Bu teoriye göre, demir barsak mukoza hücreleri tarafından alındıktan sonra, mukoza hücrelerinde bulunan apoferritinle birleşerek ferritini meydana getirir. Vücudun gereksinmesine göre demir ferritinden ayrılıp transferrinle birleşerek gereken yerlere iletilir. Emilimi hızlandıran veya yavaşlatan etken, mukoza hücrelerinin ferritinle doyma derecesidir. Buna göre, emilim ancak demirin ferritinden ayrılarak plazmaya geçmesi ile mümkün olur (65). Böylece mukozaya gelen demir miktarının fazla olmadığı hallerde, "mukozal blok olayı" etkili olmakta ve emilim ayarlanabilmektedir. Ancak, mukozaya gelen demir miktarında artış olduğunda, mukozanın blokaj kapasitesi yetersiz kalır ve demir pasif difüzyonla plazmaya geçebilir (5).

Ayrıca, demir, mekanizması tam açıklanmamış aktif bir emilimle de barsak mukoza epitel hücrelerine geçer(16).

Son zamanlarda, demirin absorplanma mekanizmasında yeni bir model ortaya atılmıştır. Buna göre; duodenal ve jejunal mukoza sekresyonlarında bulunan apotransferrin, transferrini oluşturmak üzere besin demiri ile reaksiyona girer. Daha sonra transferrine bağlanan demir, mukoza hücreleri içine endositotik bir işlemle alınmaktadır. Hücre içinde transferrinden serbestleyen demir ya kana geçmekte ya da mukozal ferritin olarak depolanmaktadır. Demir eksikliğinde serbestleyen demir kana geçer, fazlalığında ise depolanır (41).

Normal günlük besinlerle alınan 10-15 mg. kadar demirin ancak 0.6 mg'ı emilebilir. Atılım ise, özellikle feçesle olur ki, bu, günde yaklaşık 0.4 mg. kadardır. Ayrıca idrar, ter, deri dökülmesi, saç ve tırnaklar yoluyla da günde 0.2 mg. Fe atılır. Çocukluk çağında, menstruasyon ve gebelik sürelerince demir gereksinimi normalin birkaç katına çıkabilir. Eğer bu durumlarda emilim aynı düzeye yükselmezse, demir eksikliği ortaya çıkabilir (5).

Fosfat (yumurta) ve fitat (tahıllar) gibi maddeler demirle suda çözünmeyen bileşikler meydana getirdiklerinden, demirin emilmesini güçleştirirler. Buna karşı, askorbik asit, C vitamini, besinlerden demirin emilmesini kolaylaştırır. Mide HCL asidi redüktan etkisi ($Fe^{+++} \longrightarrow Fe^{++}$) dolayısıyla, emilimi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, mide öz suyunda bulunan gastroferrin adındaki bir mukoprotein demirle bağlanabilir. Ancak bu maddenin emilimdeki rolü tam açıklanmamıştır (5).

Çay (tannik asit) ve oksalatlı besinler emilimi azaltıcı etkenler olarak bilinirler (16). Çok az miktarda (0-5 µg/ml. demir içeren ferrilaktin insan sütünden elde edilmiştir. Özellikle inek sütü ile beslenen çocuklarda anemiye

neden olduğu ve bu aneminin de az miktarda demir içeren bu sütün barsak epitel hücrelerinden emilirken deskuamasyon sonucunda oluştuğu bildirilmiştir (16,65). Yine toprak ve kil yeme alışkanlığı olan insanlarda (pika), bu maddelerin demirle çözünmeyen kelasyonlar meydana getirdikleri ve emilimi engelledikleri bilinir (5).

Demir emilimini arttıran etkenlere gelince; aşırı demir alınması ile fruktoz, histidin, lizin gibi amino asitlerin emilimi kolaylaştırdıkları ve dolayısıyla dokular- da demir birikmesi meydana getirdiği bilinir (16). Depola- nan bu demirin yarısı karaciğerde, çözünmesi güç demir bi- leşiği olan hemosiderin şeklinde bulunur. Özellikle hemok- romatozisde karaciğerde biriken demir miktarı 50 g.'a kadar çıkabilir (5).

Bakır

Yaklaşık 150 yıl kadar önce, bakırın bitki ve hayvan dokularında bulunduğu gösterilmiştir. 1878'de Fredericq(30) bakır içeren bir pigment olan hemosiyaninin bir solunum bi- leşiği olduğunu kanıtlamıştır. Bakır içeren hemosiyanin pig- menti birçok yumuşakçalarda bulunur ve kanda hemoglobinin yerini alır (100). 1928'de Hart et al. (40), omurgalılarda aneminin önlenmesinde bakırın çok önemli bir rolü olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Heme A'nın sentezinde, bir bakır metallo-enzimi olan sitokrom oksidazın gerekli olduğu, böylece de bakırın biyo- kimyasal olarak anlamlı bir katalizör görevi gördüğü kanıt- lanmıştır. Bilindiği gibi, sitokrom oksidaz; mitokondriler- de elektronların sitokromlardan oksijene transportunu kata- lize eder(65).

Değişik hücre tiplerinden elde edilen plazma membran- larının redoks enzimlerini (NADH oksidaz, ksantin oksidaz gibi) içerdikleri saptanmıştır. Bu bulgular, plazma membran- larının anlamlı miktarlarda demir ve diğer metalleri

içerdiklerini düşündürmüştür. MacKellar ve Crane (52), bu amaçla sıçan ve domuz eritrositlerinin plazma membranlarıyla yaptıkları çalışmalarda, bunlarda demir ve bakır bulunduğunu göstermişlerdir.

Underwood (92), çeşitli memeli türlerinde, bakır eksikliğine bağlı olarak, saç ve tüylerde, pigmentasyon eksikliğinin oluştuğunu göstermiştir. Siyah tüylü koyunlarda, bakır ilâvesiyle pigmentasyon bantlarının oluştuğu saptanmıştır. Bakırın, melaninin oluşmasındaki etkisi ile tiro - sinaz enzimi aktive edilir (59).

Tirosin $\xrightarrow{\text{Tirosinaz}}$ dopa $\xrightarrow{\text{Tirosinaz}}$ dopakinon \rightarrow
2.3-dihidro-5.6-dihidroksindol-2-karboksilat \rightarrow dopakrom \rightarrow
melanin.

Bakır metabolizması: Yeni doğanlarda ve erginlik çağında bulunan kişilerde, vücut ağırlığına göre bakır miktarı erişkinlerden daha fazladır. Yeni doğanlarda bu miktar 4.7 µg/100ml. ve erişkinlerde ise 1.7 µg/100ml. dir(65)..

Normal bir erişkinde yaklaşık 80 mg. bakır bulunur. Bunun 23 mg.'ı karaciğer, kalp, dalak, böbrekler ve kan dokusunda dağılmıştır. Karaciğer ve beyin dokusunda bulunan bakır düzeyi oldukça yüksektir (8 mg.). Prostat, tiroid ve timusta bakır düşük düzeyde; dalak, pankreas, kaslar, deri ve kemiklerde orta derecede; karaciğer ve beyinden başka böbrekler, kalp ve saçlarda yüksek oranda bakıra rastlanır.

Kanda bulunan bakırın %0.34'ü bir bakırlı protein olan hemokuprein halindedir. Bu maddenin eritrositlerden izole edilmiş olmasından dolayıdır ki, eritrokuprein adı verilmiştir. Eritrokuprein 35.000 molekül ağırlığında olup, her molekülü 2 atom bakır içerir. Eritrositlerdeki bakırın %60'ı süperoksit dismutaz enzimi şeklinde bulunur; eritrokuprein (72). Bu enzim serbest anyon radikallerinin hidrojen peroksit ve oksijene oksidasyonunu katalize eder (72).



Süperoksit dismutaz, sitoplazma ve mitokondrilerde olmak üzere iki şekilde bulunur; aktivitesi için askorbik asit ve vitamin E gereklidir (50).

Plazmada ise bakır, molekül ağırlığı 151.000 olan ve her molekülünde 8 atom bakır bulunan seruloplazmin denilen bakır—protein bileşiği şeklinde bulunur. Seruloplazminin esas görevi demirin hücrelerden plazmaya geçişini sağlamaktır. Etkisi, mukoza hücrelerinde bulunan ferröz (Fe^{++}) demirin oksidasyonunu katalize etmektir. Bu olay sonunda ferröz demir ferrik demire ($Fe^{++} \longrightarrow Fe^{+++}$) çevrilir ve transferrine bağlanması kolaylaşır (72,102).

Bakır, dokular düzeyinde bir proteine bağlı olarak taşınır. Bakır-protein bileşiminin adı bulunduğu dokuya göre değişmektedir. Örneğin; eritrositlerde eritrokuprein (hemokuprein), beyinde serebrokuprein ve karaciğerde hepatokuprein adı ile tanımlanır (14,72). Gerçekte bu bileşikler yapısal farklılık göstermezler (19).

Seruloplazmin karaciğerde sentez edilerek seruma salgılanır. Eritrokupreinin kemik iliğinde normoblastlarda sentez edildiği zannedilmektedir. Hepatik bakır ise, safraya salgılanır (65). Ayrıca, az miktardaki bakır serum albuminine reversibl olarak bağlanarak kanda dolaşır (72).

Bakırın Emilimi.— İnsanda bakırın özellikle absorbe edildiği yer duodenumdur. Oral yoldan alınan bakırın yaklaşık %32'si absorbe edilir. Ancak, bakırın, absorpsiyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir (92). Bakırın absorpsiyonuna etkili çeşitli maddeler ve faktörler vardır. Besinlerle yüksek miktarlarda alınan kalsiyum karbonat barsak pH'sını arttırdığından, ferröz (Fe^{++}) sülfid ise erimeyen bakır sülfidi meydana getirdiğinden, emilimi azaltırlar.

Bakırın emilimi fitatların alınmasıyla inhibe edilir. Askorbik asit ise bakır eksikliğini arttırır. Çinko, molibden ve kadmiyum ise bakırın kullanımını ters olarak etkilerler (92).

Bakırın Atılımı.- Besinlerle alınan bakırın büyük bir kısmı feçesle atılır (58). Atılan bu bakır absorbe edilmeyen bakırdır. Bakırın atılmasında esas yol safra sistemidir (102). Alınan bakırın (2-5 mg/gün), %32'si emilir (0.6-1 mg/gün); kalanın büyük bir kısmı (0.5-1.3 mg/gün) safra ile, direkt olarak barsaklara geçen miktarından (0.1-0.3 mg/gün) arta kalan kısım ise, idrarla (0.01-0.06 mg/gün) atılır(65).

Nefrozda ve Wilson hastalığı ile birlikte görülen hipokupremide, üriner yoldan bakır atılımı artar. Bu durumda plazma bakır düzeyi, seruloplazmin düzeyi ile sıkı ilişkilidir (93).

Genellikle kronik ve akut infeksiyonlarda, lösemide ve çeşitli anemilerde hiperkupremi meydana gelir (99). Hiper-tiroidide ise, plazma bakır artmış; buna karşı eritrositlerdeki bakır miktarı azalmıştır (52).

Çinko

Canlılarda çinkonun önemi ilk kez 1869 yılında Raulin (70) tarafından ileri sürülmüş, bu elementin Aspergillus niger adlı bir mantarın büyümesinde gerekli olduğu belirtilmiştir. Çok seneler sonra, 1961 yılında, Prasad et al. (67) çinkonun insandaki fonksiyonu ile ilgili bulgularını yayınlamışlardır. Bu araştırmacılara göre, çinko eksikliği bulunan erkek hastalarda cücelik, anemi, hipoganodizm, hepato-splenomegali, buruşuk ve kuru deri gibi çeşitli anomali ve semptomlar gözlenir. Benzer belirtiler 1955'de Reimann (71) tarafından Türkiye'de de saptanmış; ancak nedenleri hakkında ayrıntılı açıklama verilmeyip, genetik bir bozukluğa bağlı olabilecekleri bildirilmiştir.

Çinkonun Biyokimyası: Yaklaşık 100'e yakın metallo-enzimin yapısında çinko bulunur (60). Demir ve bakır enzimlerinin, özellikle karakteristik renkleri nedeniyle, uzun zamandan beri bilinmelerine karşın, çinkonun enzimlerdeki yeri ancak son zamanlarda saptanmıştır (65).

DNA ve RNA polymeraz enzimlerinin yapısında çinkonun bulunduğu son yıllarda anlaşılmış; RNAase enziminin aktivasyonu için eksojen çinkonun gerekli olduğu da belirlenmiştir. Bu nedenle, çinkonun RNA ve DNA metabolizmasında çok önemli bir rolü olduğu söylenmektedir (65).

Intrasellüler metabolik olaylarda çinkonun özellikle inhibitör bir etki yaptığı bilinir. Dolaylı yoldan meydana gelen bu etkinin mekanizması şöylece açıklanır: Çeşitli hücrelerde metabolik olayları düzenleyen Ca^{++} , Calmodulin adı verilen bir protein aracılığı ile enzimleri aktive eder. Ca-Calmodulin kompleksinin hücre enzimleri üzerindeki bu aktive edici etkisi ise, Zn^{++} ile inhibe edilir. Bu nedenle, Ca^{++} ile Zn^{++} 'nin Calmodulin üzerinde antagonist etkileri olduğu ileri sürülmüştür (10,65).

Hücre içinde aşırı birikimi nedeniyle, eritrositin büzülmesine ve oraklaşmaya kalsiyum iyonu neden olmaktadır. Tedavide ise, çinko ve fenotiyozin gibi inhibitör ajanların kombinasyonu kullanılabilir (10).

Pankreas çinko metabolizmasına en duyar organlardan biridir. Langerhans adacıklarının β - hücreleri fazla miktarda çinko depolayabilme ve kullanabilme yeteneğine sahiptir. İnsülin, pankreasta proinsulinden sentez edilir. Proinsulini insuline çeviren enzimler ise, pankreasın çinko içeren enzimleri olan tripsin ve karboksi-peptidaz B'dir. Böylece çinko metabolizmasındaki değişiklikler insülin oluşumunu da etkilemektedir (75).

Çinko'nun metabolizması.- Karaciğer, böbrekler, kemikler, retina, prostat ve kas gibi dokular çinkodan oldukça zengindir. Vücutta bulunan yaklaşık 1,4-2,3 g. çinkonun büyük bir kısmı deri ve kemiklerde bulunur (72). Tüm kanda bulunan çinkonun %75-85'i eritrositlerde karbonik anhidraz enzimi halinde, %12-22'si plazmada, %3'ü ise lökositlerde yer alır (62). Çinkonun trombositlerde de bulunduğu ve salgılandığı gösterilmiştir (1). İnsan ve inek sütünün de çinko bakımından oldukça zengin olduğu bilinir; her ikisinde çinko miktarı (3-5 mg/1.) arasındadır. Kolostrum ise, normal süte oranla çinkodan 3-4 kez daha zengindir (62,93).

Plazmada demir taşıyan transferrin veya bakır taşıyan seruloplazmin gibi özel taşıyıcı proteinler bulunmasına karşın, çinko için böyle bir taşıyıcı henüz saptanmamıştır (62).

Demir ve bakır, normal olarak fetal hayatta depolanan elementlerdir. Oysa çinko için böyle bir depolanmadan söz edilmemektedir (93).

Çinkonun fazla tutulduğu ve kullanıldığı (turn-over) dokuların saptanması amacıyla Zn^{65} radyoisotopu ile incelemeler yapılmıştır. Alınan sonuçlara göre karaciğer, böbrek, dalak, barsak mukozası, akciğerler ve pankreasda hızlı bir tutulma ve kullanım saptanmıştır. Buna karşı kas ve eritrositlerde daha yavaş, saç ve kemiklerde ise kullanımın çok yavaş olduğu gösterilmiştir (12). Çinkonun plazmadan hücrelere taşınma mekanizması henüz bilinmemektedir (12).

Çinko'nun emilimi.- Günlük besinlerle alınan ortalama 10-15 mg. çinkonun yaklaşık 5 mg'ı ince barsaklardan emilir (12). Bu emilim mekanizması da tam olarak bilinmemektedir (12). İnsanda, çinkonun absorpsiyon yerleri ve mekanizmalarının aktif, pasif veya seçimli transportuna ait bilgiler yetersizdir (65). Emiliminde besindeki çinko düzeyinin, vücuttaki miktarının, kalsiyum, D vitamini, fitatların ve

diğer bağlayıcı ajanların etkili oldukları belirtilmiştir (65). Kalsiyum çinkonun fitatlarla bağlanmasını arttırır. Buna karşın EDTA kompleksleri çinko emilimini olumlu yönde etkilerler (65). Jeofajya 'da ise yenen kil hem demir hem de çinko emilimini engeller (12). Bu etkinin, kil içersinde bulunan fosfattan kaynaklandığı sanılmaktadır (65).

Çinko'nun Atılımı.- Her ne kadar çinkonun başlıca feçesle atıldığı bilinir ise de, mekanizması belli değildir (12). İdrarla çok az miktarda (300-700 mg/24 saat) ve ter ile ise 1 mg/l. kadar çinko atılmaktadır (12).

Çinko eksikliği.- Çinko eksikliği, özellikle büyüme çağındaki çocuklarda cüceliğe ve seksüel gelişim bozukluğuna neden olmaktadır. Ancak bu bozukluk besinle düzeltilmektedir (72). Tam açıklaması yapılamamasına karşın üremi, lösemi, pernisiyöz anemi ve oral kontraseptiflerin kullanılmasından sonra serum çinko değerlerinin düştüğü saptanmıştır (12). Akut miyokard enfarktüslü hastalarda yapılan çalışmalarda, serumda manganezin çok arttığı, bakır ve çinkonun ise çok düştüğü gözlenmiştir (94).

Orak hücre anemisinde plazma ve eritrosit çinko düzeylerinin düştüğü, buna karşı idrarla çinko atılımının arttığı saptanmıştır (68). Burada artan çinko atılımının çinko eksikliğine neden olduğu ileri sürülmektedir.

Çinko fazlalığı.- Plazmada çinko düzeyinin artması halinde klinik bir anomali saptanmamıştır. Aynı şekilde, metabolik veya emilim bozukluğu ile serumda çinko fazlalığı arasındaki ilişki de henüz açıklanamamıştır (65).

ARASTIRMANIN AMACI

"Genel Bilgiler" bölümünde etraflı olarak açıklandığı gibi, kronik hipoksik hipoksinin etkisiyle organizmada eritropoietik faaliyet hızlanır ve polisitemi oluşur. Böyle bir etki, nispeten uzun bir süre yüksek irtifalarda ikamet süresinde gözleendiği gibi, yapay olarak deney hayvanlarını düşük basınç kamarasında, belli bir basınç düzeyinde, bulundurmak suretiyle de kanıtlanabilir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda eser elementlerin, çeşitli enzimlerin yapısında buldukları ve/veya bazı reaksiyonlarda katalizör görevi gördükleri kanıtlanmıştır (65,72,75). Her ne kadar eser elementlerin eritropoez mekanizmasındaki rolleri ile ilgili bazı çalışmalar özellikle insanda yapılmış ise de (15,17,24,27,69) konu tam anlamıyla aydınlığa kavuşmamıştır. Bu nedenle biz bu çalışmayı planladık; nispeten uzun süre, düşük basınç kamarasında kronik hipoksik hipoksiye tabi tutulan ve bu suretle polisitemi oluşturulan tavşanlarda eritroister parametreler ile kanda demir, bakır ve çinko düzeylerinin nasıl değiştiklerini saptadık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda vücut ağırlıkları 2,7-3,8 kg. arasında değişen ortalama 3,1 kg. olan her iki cinsten 12 Yeni Zelanda türü albino tavşan kullanıldı.

Deney hayvanlarında önce çeşitli parametreler tayin edildi ve bu suretle saptanan inisyel değerler kontrol değerleri olarak kabul edildi. İlk tayin işlemlerinden sonra tavşanlar polisitemi oluşturmak amacı ile düşük basınç kamerasında aralıklı kronik hipoksik hipoksiye tâbi tutuldu. Kamaranın basıncı 340 torr'a (0.44 At.) ayarlandı ve deney hayvanları her gün 22 saat olmak üzere, ortalama 23 gün süre ile toplam 550 saat düşük basınçta tutuldu. Düşük basınç kamerası, hergün 2 saat açık bırakıldı ve bu sürede deney hayvanları ve kamera temizlendi. Deney süresinde solunumla atılan CO₂ kamaraya özel bir aygıt içinde yerleştirilen Sodalime (NaOH, Cumcalce) ile absorblandı. Bu maddenin hergün değiştirilmesine özen gösterildi.

Ancak, 12 tavşandan 3'ü teknik nedenlerle öldüklerinden dolayı, geride kalan 9 tavşan polisitemik, eksperimental grubumuzu oluşturdu.

Eritrositer Parametrelerin Tayini

Araştırmamızda eritrosit sayısı, % hematokrit değeri, % hemoglobin konsantrasyonu ve % retikülosit sayısı saptandı (3,98). Bu değerlerden MCV, MCH ve MCHC değerleri hesaplandı (3,98).

Eritrosit sayımı: Kulak venasından alınan kan hayem eriyiği ile sulandırılarak Neubauer hemositometresinde çift olarak sayıldı ve ortalaması alındı.

% Hematokrit tayini: Kulak venasından alınan kan mikro-hematokrit yöntemi ile heparinli Hawksley mikro-hematokrit tüplerinde çift olarak yapıldı ve ortalaması alındı.

Hemoglobin Konsantrasyonu: Kulak venasından alınan kan Beckman spektrofotometresinde (model DB-GT), 540 nm. dalga boyunda ölçüldü ve bulunan değerler % g. olarak ifade edildi.

% Retikülosit: 0.5 mg. parlak kresil mavisi (İng: Brilliant Cresyl blue), 100 ml. saf alkolde (%99.9)eritilip, %0.5'lik boya çözeltisi hazırlandı. Alkolle temizlenmiş bir lâm üzerine ince bir tabaka halinde çözeltiden sürülüp kuruması beklendi. Kulak venasından alınan çok küçük bir likeminli kan damlası lâmin üzerine damlatıldı ve üzerine lâmel kapatıldı. Kanın homojen bir şekilde dağıtılmasından sonra, lâmelin etrafı vazelinle kapatıldı. Mikroskopun büyük büyütmesi altında 1000 eritrosite düşen retikülosit oranı belirlendi.

Tayin Edilen Değerlerden Hesaplanan Bazı Eritrositer Parametreler: MCV (Tek eritrosit ortalama hacmi, İng.: Mean Corpuscular Volume):

$$\frac{100 \text{ ml. kandaki eritrosit hacmi (\% Hct.)} \times 10}{\text{Eritrosit sayısı (1 x 10}^6)}$$

MCH (Tek eritrosit ortalama hemoglobin değeri, İng.: Mean Corpuscular Hemoglobin):

$$\frac{\text{Hemoglobin (100 ml. kanda g. cinsinden)}}{\text{Eritrosit sayısı (1 x 10}^6)}$$

MCHC (Eritrosit ortalama hemoglobin konsantrasyonu, İng.: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration):

$$\frac{\text{Hemoglobin (100 ml. kanda g. cinsinden)} \times 100}{100 \text{ ml. kandaki eritrosit hacmi (\% Hct.)}$$

Eser Elementler

Araştırmamızda Fe (demir), Cu (bakır) ve Zn (çinko) ile TIBC (total demir bağlama kapasitesi, İng.: Total Iron Binding Capacity) miktarları ölçüldü ve bu değerlerden % Tr.S. (transferin saturasyonu, İng.: Transferrin Saturation) hesaplandı.

Eser elementlerin saptanması sırasında cam malzemeden gelebilecek kontaminasyonu engellemek için özellikle plâstik malzeme kullanımına özen gösterildi (2,56,61,63). Diğer cam aygıtlar ise, temizleme solüsyonunda iki saat süreyle tutuldu (29).

Tüm malzeme önce musluk suyunda tek tek, sonra distile su ve daha sonra da deiyonize su ile üç kez yıkanarak etüvde kurutuldu. Kullanılan malzemelerin temizliğini test etmek amacıyla önce deiyonize su ile ölçümler yapıldı (48). Sonuçta herhangi bir kontaminasyonun olmadığı saptandıktan sonra deneysel ölçümlere geçildi.

Kan Örneklerinin Alınması ve Ölçüm Yöntemleri: İnisyal (kontrol) değerleri saptamak için, tavşanlar sabah tartıldıktan sonra, kulak venasından kan alındı. Bu işlem sırasında enjektör kullanmadan paslanmaz çelikten yapılmış bir iğneden yararlanıldı. Bu iğne aracılığı ile mineralden temizlenmiş plâstik tüplere damla damla kan toplandı. Tüpün ağzı hemen parafilm ile kapatıldı (72,95). Toplanan kan santrifüje edilerek serumu ayrıldı.

Serumda demir, bakır, çinko miktarlarını (74) ve total demir bağlama kapasitesini saptamak için serum iki kısma ayrıldı (78).

Bir kısmı ile serumda demir, bakır ve çinko miktarları tayin edildi (79). Diğer kısmı ile serum total demir bağlama kapasitesi ölçüldü. Serumlar atomik absorpsiyon

spektrofotometresinde ölçülmeye hazır hale getirildi ve âlette ölçülene kadar tüplerin ağzı parafilm ile kapatıldı, buzlukta -20°C 'da saklandı (2,48,64).

Serum örneklerinin -20°C 'daki buzlukta saklanmasıdaki amaç, düşük temperatürde iyon aktivitelerinin azalmış olması ve örnekle tüpler arasındaki interaksiyonun zayıflamasından dolayıdır (55).

Aynı uygulamalar, düşük basınç kamarasında aralıklı kronik hipoksik hipoksi uygulanarak polisitemi oluşturulan deney grubunda tekrar edildi. Toplanan deney tüpleri en geç üç hafta içinde "Perkin-Elmer Model 403" atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçüldü (29,61,63,64,83).

Atomik absorpsiyon spektrofotometresinin çalışma prensibi: Alev üzerine püskürtülen biyolojik materyalden (serum) geçen ışığın, mineral atomu tarafından absorpsiyonunu ölçme esasına dayanır (35).

Kullanılan Kimyasal Maddeler

% 20'lik TCA çözeltisi: Triklor asetik asitin (TCA) deiyonize sudaki % 20'lik çözeltisi hazırlandı.

Demir Klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi: 0.484 g. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 litre deiyonize suda çözüldü. Bu çözeltiden 50 ml. alındı ve deiyonize suyla litreye tamamlandı. Bu suretle sulandırılmış çözelti 500 $\mu\text{g.Fe}/100$ ml. içerir.

Magnezyum Karbonat: 4 MgCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$.

Fe Tayini: Stok Solüsyon I: (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.). 1.000 g. demir tel 50 ml. (1+1) HNO_3 içerisinde eritildi. Bu çözelti deiyonize su ile litreye tamamlandı.

Stok Solüsyon II:(10 µg./ml.). Stok I'den 1 ml. alınıp deiyonize su ile 100 ml.'ye tamamlandı.

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması:

İçerisinde 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, µg/ml.

Fe içeren çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

<u>C</u>	<u>Stok II</u>	<u>Deiyonize su</u>
0,2 µg/ml.	1 ml.	50 ml.'ye tamamlandı.
0,5 µg/ml.	2,5 ml.	50 " "
1 µg/ml.	5 ml.	50 " "
2 µg/ml..	10 ml.	50 " "
3 µg/ml.	15 ml.	50 " "
4 µg/ml.	20	50 " "

Cu Tayini:Stok Solüsyon I: (1000 µg/ml.) 1.000 g.

bakır çok az bir miktar (1+1) HNO₃ içerisinde eritildi ve % 1(v/v) HNO₃ ile litre-ye tamamlandı.

Stok Solüsyon II: (10 µg/ml.). Stok I'den 1 ml. alınıp deiyonize su ile 100 ml.'ye tamamlandı.

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması:

İçerisinde 0.2, 0.5, 1 µg/ml. Cu içeren çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

<u>C</u>	<u>Stok II</u>	<u>Deiyonize su</u>
0.2 µg/ml.	1 ml.	50 ml.'ye tamamlandı.
0.5 µg/ml.	2.5 ml.	50 " "
1 µg/ml.	5 ml.	50 " "

Zn tayini:Stok solüsyon I: (500 µg/ml.). 0.500 g.

çinko çok az bir miktar (1+1) HCl içerisinde eritildi. Bu çözeltiler %1 HCl ile litre-ye tamamlandı.

Stok solüsyon II:(10 µg/ml.). Stok I'den 2 ml. alındı ve deiyonize su ile 100 ml.'ye tamamlandı.

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması:
İçerisinde 0.2, 0.5, 1 µg/ml. Zn içeren çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

<u>C</u>	<u>Stok II</u>	<u>Deiyonize su</u>
0.2 µg/ml.	1 ml.	50 ml'ye tamamlandı
0.5 µg/ml.	2.5 ml.	50 " "
1 µg/ml.	5 ml.	50 " "

Deney Düzeni:

Fe (demir), Cu (bakır), Zn (çinko) ölçümü için serum örneklerinin hazırlanması:

Plastik bir tüpe 1 ml. serum konulduktan sonra üzerine 1 ml. %20'lik TCA (Triklor asetik asit) eklendi. Tüp kapatılarak karıştırıldı ve etüvde 90°C'da, 15 dakika süre ile bekletildi. Soğuduğunda santrifüje edildi. Süpernatant başka bir temiz plastik tüpe alınıp tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı. Serum Fe, Cu ve Zn miktarları aynı tüplerde tek bir örnekte okundu (48,61,63).

Kör çözeltilisinin hazırlanması: Serum yerine deiyonize su kullanılarak yukardaki şekilde hazırlandı, tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı.

T.I.B.C. (Total demir bağlama kapasitesi) ölçümü için serum örneklerinin hazırlanması: 2 ml. serum plastik bir tüpe kondu; üzerine 2 ml. sulandırılmış FeCl₃ (demir klorür) çözeltisi (500 µgFe/100 ml.) eklendi, karıştırıldı ve 5 dakika bekletildi. Üzerine 200 mg. MgCO₃ (magnezyum karbonat) ilave edildi. 30 dakikalık sürede 4 kez çalkalandı, santrifüje edildi. 2 ml. süpernatant başka bir temiz plastik tüpe alındı. Üzerine 2 ml. %20'lik TCA kondu. Tüp kapatıldı, karıştırıldı ve etüvde 90°C'da 15 dakika süre ile bekletildi. Soğuduğunda santrifüje edildi ve süpernatant başka bir temiz tüpe alındı. Tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı (61,63).

Kör çözeltisinin hazırlanması: Serum yerine deiyonize su kullanılarak, yukardaki şekilde hazırlandı ve tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı.

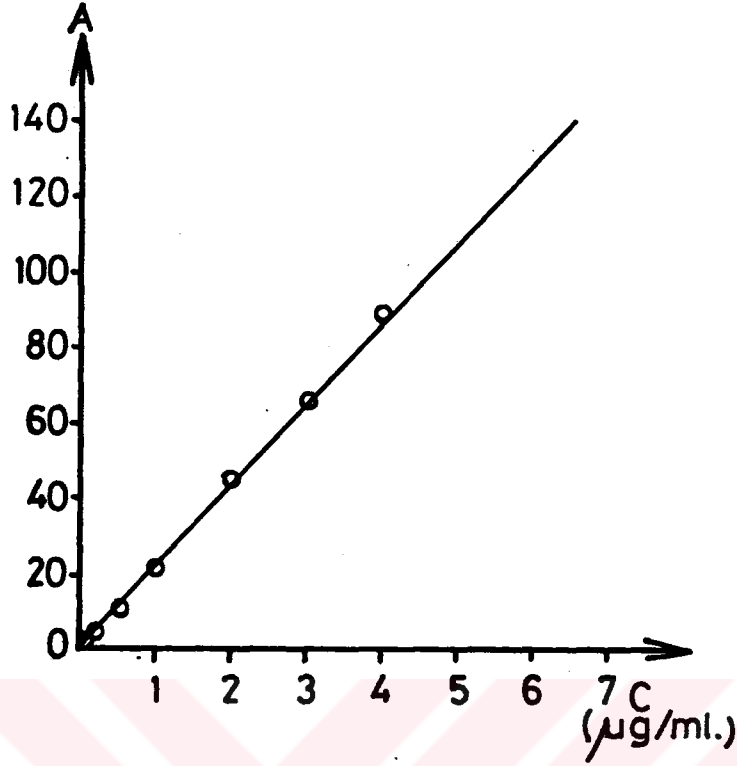
Atomik absorpsiyon spektrofotometre aletinin ölçüm için hazırlanması:

Fe ölçümü: Alete Fe lambası (Intensitron hollow) takıldı. Lamba akımı 35 mA'e ayarlanarak 15 dakika ısınması için beklendi. Aralık 0.2 nm'de (Slit 3) ve dalga boyu 248.3 nm'de örnek geçiş hızı x10 kademesinde (bu kademedeki okunan sonuç, aletin okuduğu 10 değerlerin ortalamasıdır) olmak üzere alet ayarlandı. Yakıt olarak hava-asetilen gaz karışımı kullanıldı (63).

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi ve örneklerin okunması: Önce kör çözeltisi ve standart demir çözeltilerinin absorpsiyonları A.A.S.'sinde her biri en az 3 kez okundu ve ortalamaları alındı.

<u>C</u>	<u>Absorbans</u>
0 µg. Fe/ml. çözeltisi	0
0.2 " "	4.25
0.5 " "	10.50
1 " "	21.50
2 " "	45.25
3 " "	65.50
4 " "	88.50

Okunan bu değerlerden Fe kalibrasyon grafiği çizildi.



Şekil-1: A.A.S.'sinden elde edilen Fe kalibrasyon grafiği. Absiste ml'deki madde miktarı (C), ordinatta ise absorbens değeri (A) verilmektedir.

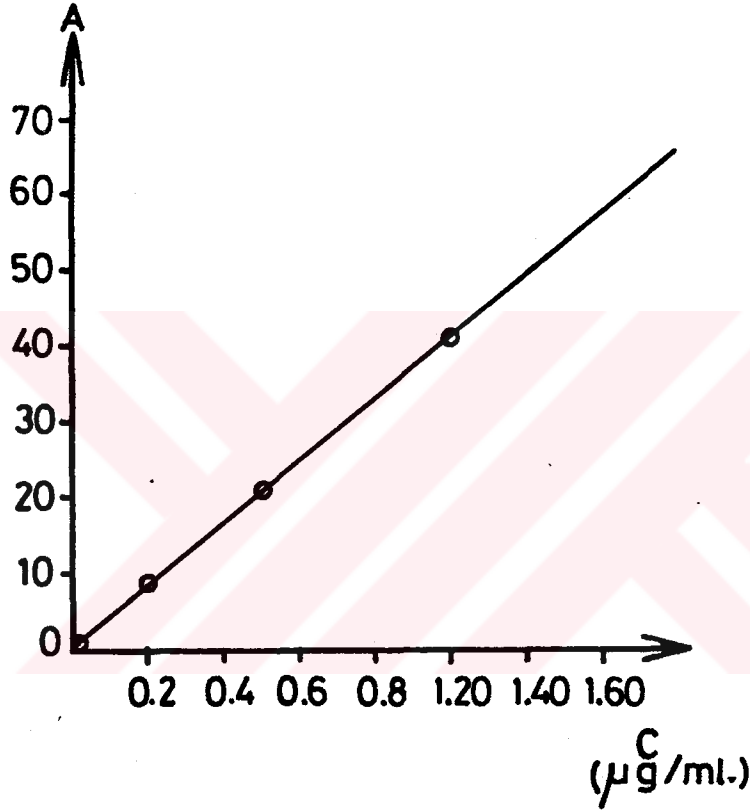
Serum örneklerinin de absorpsansları en az 3 kez okunarak ortalamaları alındı. Her 5 örnek okunduktan sonra periyodik olarak standartlarla aletin kalibrasyonu kontrol edildi. Serum örneklerinin absorpsansları grafik üzerinde değerlendirilerek serum demirinin µg/ml değeri bulundu.

Cu Ölçümü: Alete Cu lambası (Intensitron hollow) taktıldı. Lamba akımı 30 mA'e ayarlanarak 15 dakika ısınması için beklendi. Aralık 0.7 nm'de (Slit 4) ve dalga boyu 324,7 nm'de, örnek geçiş hızı x10 kademesinde olmak üzere alet ayarlandı. Yakıt olarak hava-asetilen gaz karışımı kullanıldı (63).

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi ve örneklerin okunması: Önce kör çözeltisi ve standart bakır çözeltilerinin absorpsansları A.A.S.'sinde, her biri en az 3 kez okundu ve ortalamaları alındı.

C	Absorbans
0 µg. Cu/ml. çözeltilisi	0
0.2 " "	9
0.5 " "	21
1 " "	41

Okunan bu değerlerden Cu kalibrasyon grafiği çizildi.



Şekil-2: A.A.S.'sinden elde edilen Cu kalibrasyon grafiği. Absiste ml'deki madde miktarı (C), ordinatta ise absorbans değeri (A) verilmektedir.

Serum örneklerinin de absorbansları en az 3 kez okunarak ortalamaları alındı. Her 5 örnek okunduktan sonra periyodik olarak standartlarla aletin kalibrasyonu kontrol edildi. Serum örneklerinin absorbansları grafik üzerinde değerlendirilerek serum bakırınının µg/ml. değerleri bulundu.

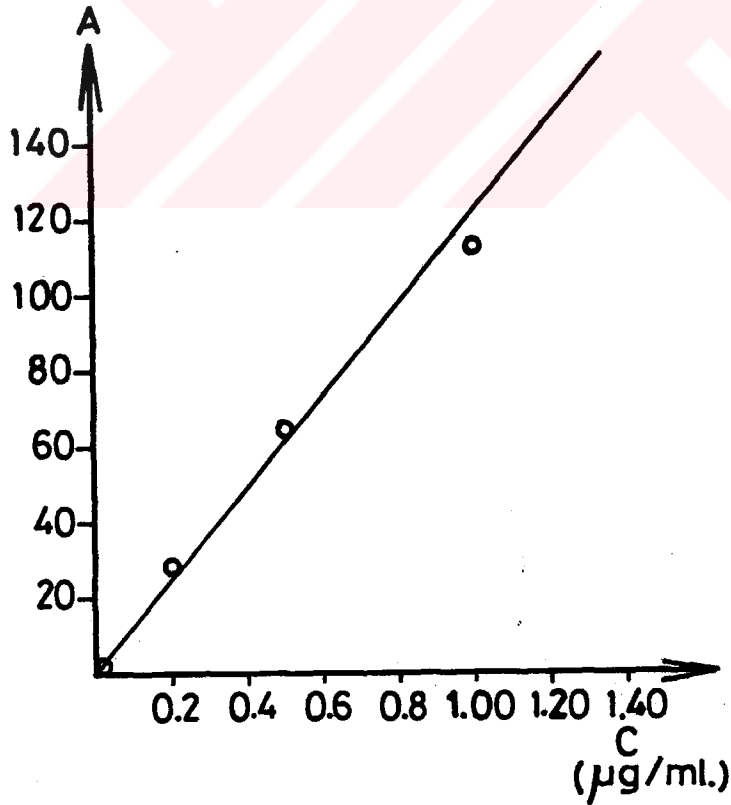
Zn ölçümü: Alete Zn lambası (Intensitron hollow) takıldı. Lamba akımı 30 mA'e ayarlanarak 15 dakika ısınması

için beklendi. Aralık 0.7 nm'de (Slit 4) ve dalga boyu 213.9 nm'de, örnek geçiş hızı x10 kademesinde olmak üzere alet ayarlandı. Yakıt olarak hava-asetilen gaz karışımı kullanıldı (63).

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi ve örneklerin okunması: Önce kör çözeltisi ve standart çinko çözeltilerinin absorbanları A.A.S.'sinde, her biri en az 3 kez okunda ve ortalamaları alındı.

<u>C</u>	<u>Absorbans</u>
0 µg Zn/ml. çözeltisi	0
0.2 " "	28
0.5 " "	65.50
1 " "	113.50

Okunan bu değerlerden Zn kalibrasyon grafiği çizildi.



Şekil-3: A.A.S.'sinden elde edilen Zn kalibrasyon grafiği. Absiste ml'deki madde miktarı (C), ordinatta ise absorban değeri (A) verilmektedir.

Serum örneklerinin de absorbanları en az 3 kez okunarak ortalamaları alındı. Her 5 örnek okunduktan sonra, periyodik olarak standartlarla aletin kalibrasyonu kontrol edildi. Serum örneklerinin absorbanları grafik üzerinde değerlendirilerek serum çinkosunun $\mu\text{g/ml}$. değerleri bulundu.

TIBC (Total demir bağlama kapasitesi) Ölçümü: Alet Fe ölçümünde olduğu gibi hazırlandı (63). Kalibrasyon grafiği olarak da demire ait kalibrasyon grafiği kullanıldı.

Serum örneklerinin absorbanları en az 3 kez okunarak ortalamaları alındı. Her 5 örnek okunduktan sonra periyodik olarak standartlarla aletin kalibrasyonu kontrol edildi. Serum örneklerinin absorbanları grafik üzerinde değerlendirilerek serum total demir bağlama kapasitesinin $\mu\text{g/ml}$. değerleri bulundu. Bulunan değer 2 ile çarpılarak serum örneğinin hazırlanmasındaki (1:2)'lik seyreltme faktörü düzeltilmiş oldu (61,63).

% Tr.S. Ölçümü: Tayin edilen serum demir ve total demir bağlama kapasitesi değerlerinden transferrin satürasyonu değeri hesaplanarak % olarak ifade edildi (19,64).

$$\% \text{ Tr.S.} = 100 \times \frac{\text{S.D.}}{\text{TIBC}}$$

Normal satürasyon %25-50 arasındadır. T.S.'nin %25-15 arasındaki değerlerine gizli demir eksikliği denir. T.S.'nin %16'nın altında olduğu vakalarda kemik iliğine gelen demir miktarlarının normal eritropoez için yeterli olmadığı gösterilmiştir (19).

BULGULARIN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

Her bir parametreye ait aritmetik ortalama, ortalama değerlerin standart sapma ve standart hata değerleri Texas Instruments (TI-59) programlanabilen makinası ile hesaplandı.

Kronik hipoksik hipoksiye tabi tutulmadan önce elde edilen değerlerle, polisitemi oluşturduktan sonra saptanan değerler arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığını saptamak amacıyla, "iki eř arasındaki farkın önemlilik testi" uygulandı (82).

B U L G U L A R

Eritrositer parametreler.- (Tablo-1)'de, toplam 550 saat süre ile düşük basınç kamarasında kronik hipoksik hipoksiye tabi tutulan ve bu suretle polisitemi oluşturulan tavşan grubunun çeşitli eritrositer parametrelerinin ortalamaları ile inisyel (kontrol) değerlerin ortalamaları verilmekte; (Şekil: 4-6)'da ise, bu parametreler karşılaştırılmaktadır. Görüldüğü gibi, polisitemik grupta % hematokrit değeri, hemoglobin konsantrasyonu, eritrosit ve retikülosit sayıları, inisyel (kontrol) değerlerden yüksektir, aradaki farklar ise çok anlamlıdır (Tablo:1, Şekil: 4). Her ne kadar polisitemik grubun ortalama tek eritrosit hacmi (M.C.V.) kontrol değerden yüksek ise de, aradaki farkın istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.05$) kadardır (Tablo:1, Şekil:5).

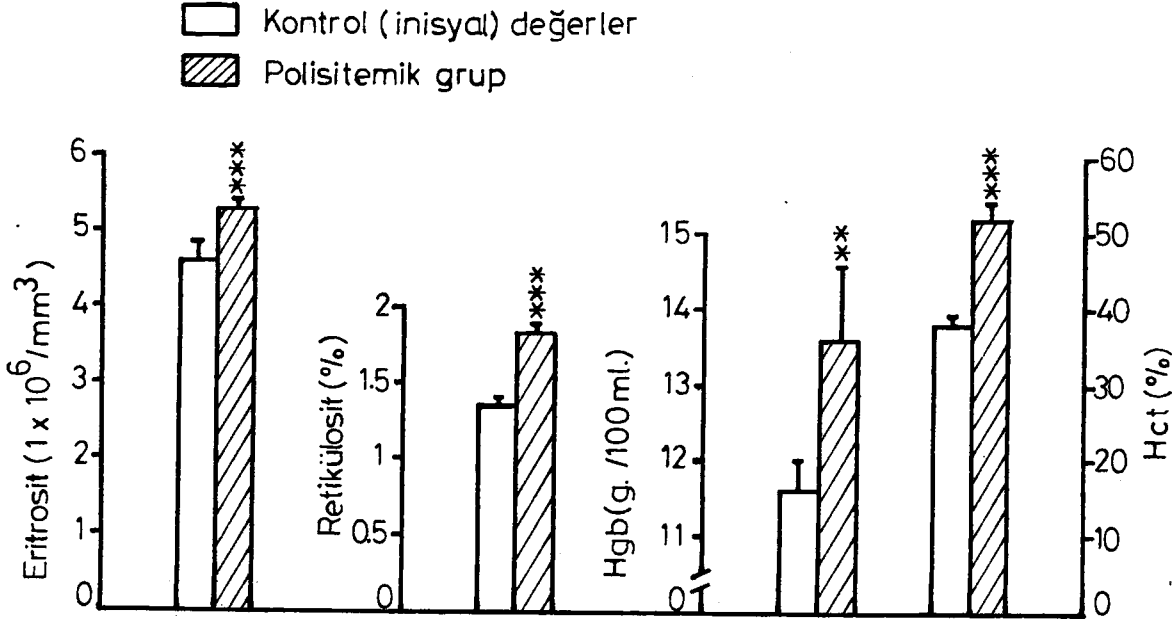
Eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonunun polisitemik grupta kontrol değerlere göre artmış olmasına karşın, tek eritrosit ortalama hemoglobin değeri (M.C.H.) daha düşük bulunmuştur (Tablo:1, Şekil: 6). Aynı şekilde, eritrosit ortalama hemoglobin konsantrasyonunun (M.C.H.C.) polisitemik grupta kontrol değere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo:1, Şekil:6).

Çeşitli parametrelerin polisitemik grupta kontrol değerlere göre ne oranlarda farklı olduklarını saptamak amacıyla, belli bir parametrenin kontrol değeri %100 olarak alınmış, her iki değer arasındaki fark bunun yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

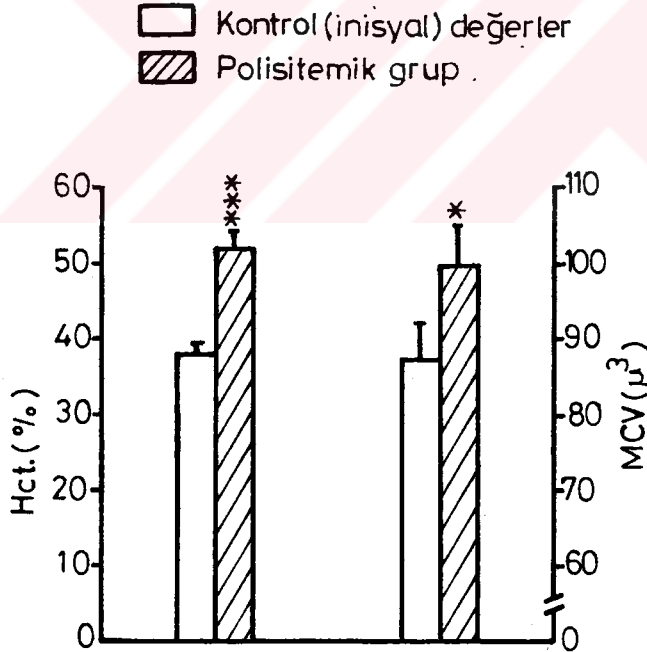
Tablo-1: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra, deney hayvanlarının belirtilen parametrelerinin ortalama (M), standart sapma (S.D.) ve standart hata (S.E.) değerleri.

Parametre	Kontrol (inisyal) değerler (n=12)		Polisitemik Grup (n=9)	
	M \pm SD	SE	M \pm SD	SE
Hct. (%)	37.9 \pm 2.8	0.8	52.1 \pm 6.9 ^{***}	2.3
Hgb. (g./100 ml.)	11.6 \pm 1.5	0.4	13.6 \pm 2.5 ^{**}	0.8
Eritrosit Sayısı (1x10 ⁶ /mm ³)	4.6 \pm 1.4	0.4	5.3 \pm 0.5 ^{***}	0.2
Retikülosit Sayısı(%)	1.3 \pm 0.8	0.2	1.8 \pm 0.2 ^{***}	0.1
M.C.V. (μ^3)	87.1 \pm 17.7	5.1	99.4 \pm 15.5 [*]	5.2
M.C.H. (γγ)	26.7 \pm 6.7	1.9	25.9 \pm 5.3 ^{***}	1.8
M.C.H.C. (%g.)	30.6 \pm 3.8	1.1	26 \pm 3.2 ^{***}	1.1

n = Deney hayvanı sayısını ve *istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

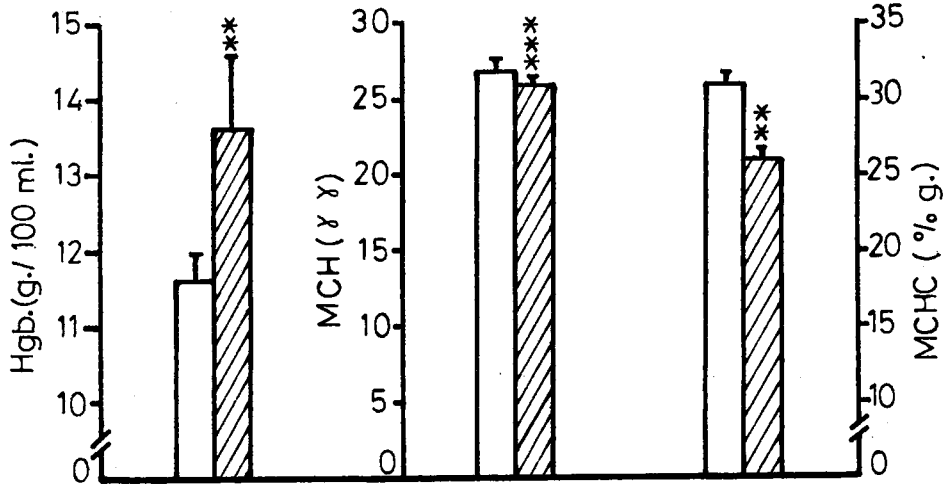


Şekil-4: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra eritrosit, retikülosit, hemoglobinin ve hematokrit değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)nı; * işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Şekil-5: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra hematokrit ve M.C.V. değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)nı; * işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

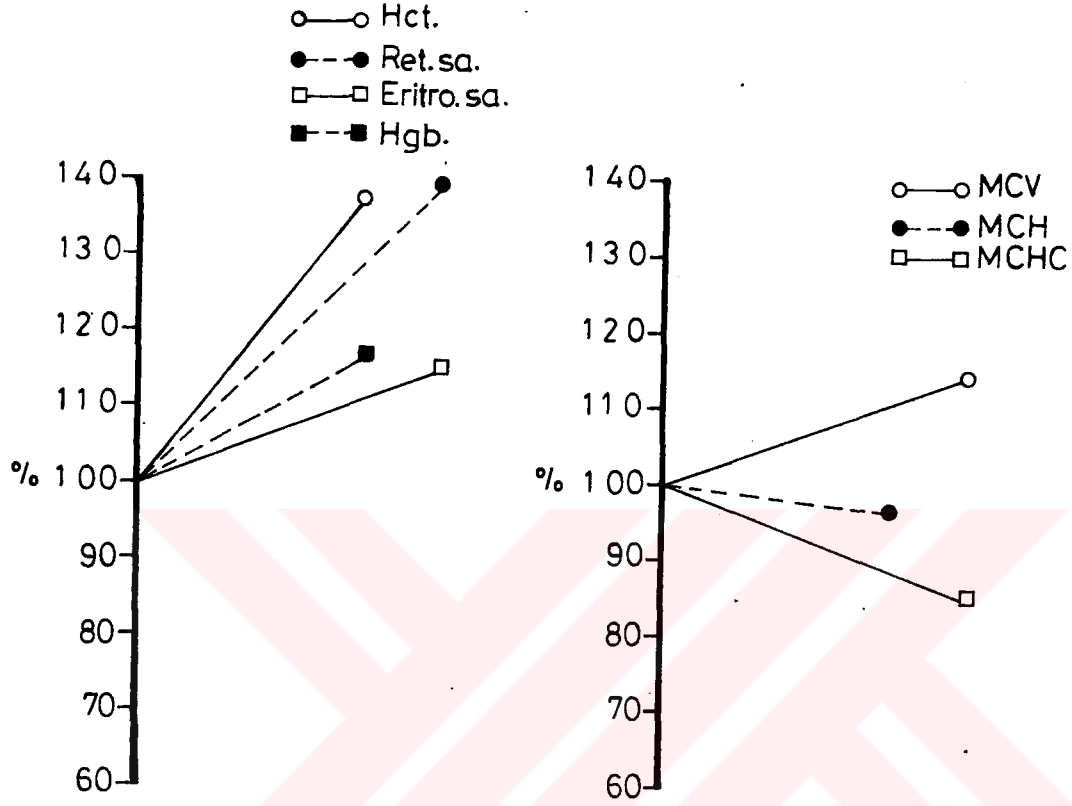
□ Kontrol (inisyal) değerler
▨ Polisitemik grup



Şekil-6: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra hemoglobin, M.C.H. ve M.C.H.C. değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)nı; *işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Bu tür hesaplamalardan elde edilen % değerler, karşılaştırmalı olarak (Şekil-7)'de yer almaktadır. Görüldüğü gibi, polisitemik grupta kontrol değere göre % hemotokrit değeri %37.5, hemoglobin konsantrasyonu %17.2, eritrosit sayısı %15.2, retikülosit sayısı %38.5 ve M.C.V. ise %14.1 oranlarında daha yüksektir. M.C.H. ve M.C.H.C.'ın ise, sırasıyla, %3 ve %15 oranlarında polisitemik grupta daha düşük oldukları saptanmıştır.

Eritrositer parametrelere ait tüm bulguların beraberce değerlendirilmesinde, kronik hipoksik hipoksinin etkisiyle eritropoietik faaliyetin hızlandığı kanıtlanmıştır.



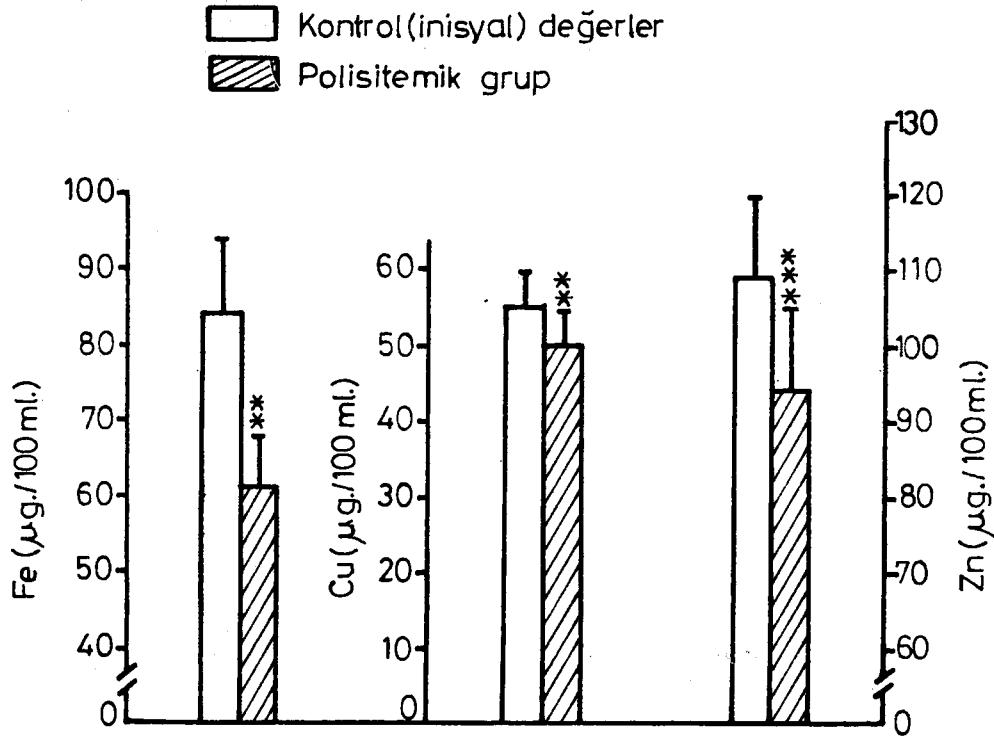
Şekil-7: Polisitemik grupta, kontrol (inisyal) değerlere göre belirtilen parametrelere ait ortalama değerlerde meydana gelen % değişimler. (Kontrol değerlerin ortalamaları %100 olarak kabul edilmiştir).

Eser elementler.- (Tablo:2)'de polisitemik gruba ait eser element, total demir bağlama kapasitesi ve transferrin saturasyonu ortalama değerleri ile benzer kontrol değerlerin ortalamaları verilmektedir. Kontrol değerlere göre polisitemik grupta incelenen her üç eser elementin, sırasıyla, demir, bakır ve çinkonun kandaki miktarları daha düşüktür; aradaki farklar istatistiksel bakımdan çok anlamlıdır (Tablo:2, Şekil:8,9).

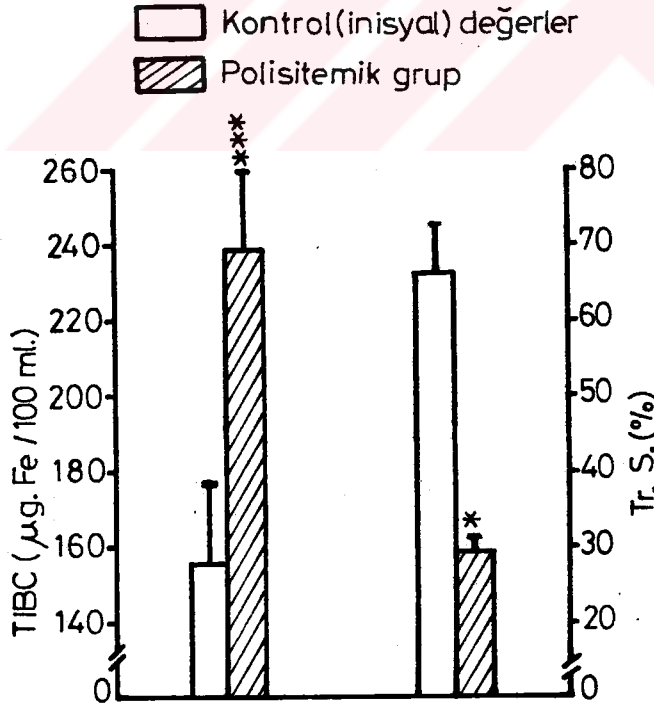
Tablo-2: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra, deney hayvanlarının belirtilen parametrelerinin ortalama (M), standart sapma (S.D.) ve standart hata (S.E.) değerleri.

Parametre	Kontrol (inisyal değerler (n=12))		Polisitemik Grup (n=9)	
	M \pm SD	SE	M \pm SD	SE
Fe ($\mu\text{g.}/100 \text{ ml.}$)	84.3 \pm 40.1	11.6	61.1 \pm 22.7 ^{**}	7.6
Cu ($\mu\text{g.}/100 \text{ ml.}$)	54.7 \pm 17.7	5.1	49.6 \pm 19.4 ^{**}	6.5
Zn ($\mu\text{g.}/100 \text{ ml.}$)	109.9 \pm 45.7	13.8	94.7 \pm 42.3 ^{***}	14.1
T.I.B.C. ($\mu\text{g Fe}/100 \text{ mL}$)	156.2 \pm 76.6	22.1	239.1 \pm 97.4 ^{***}	32.5
Tr.S. (%)	65.9 \pm 45.1	13	28.5 \pm 11.2 ^{**}	3.7

n = Deney hayvanı sayısını ve *istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

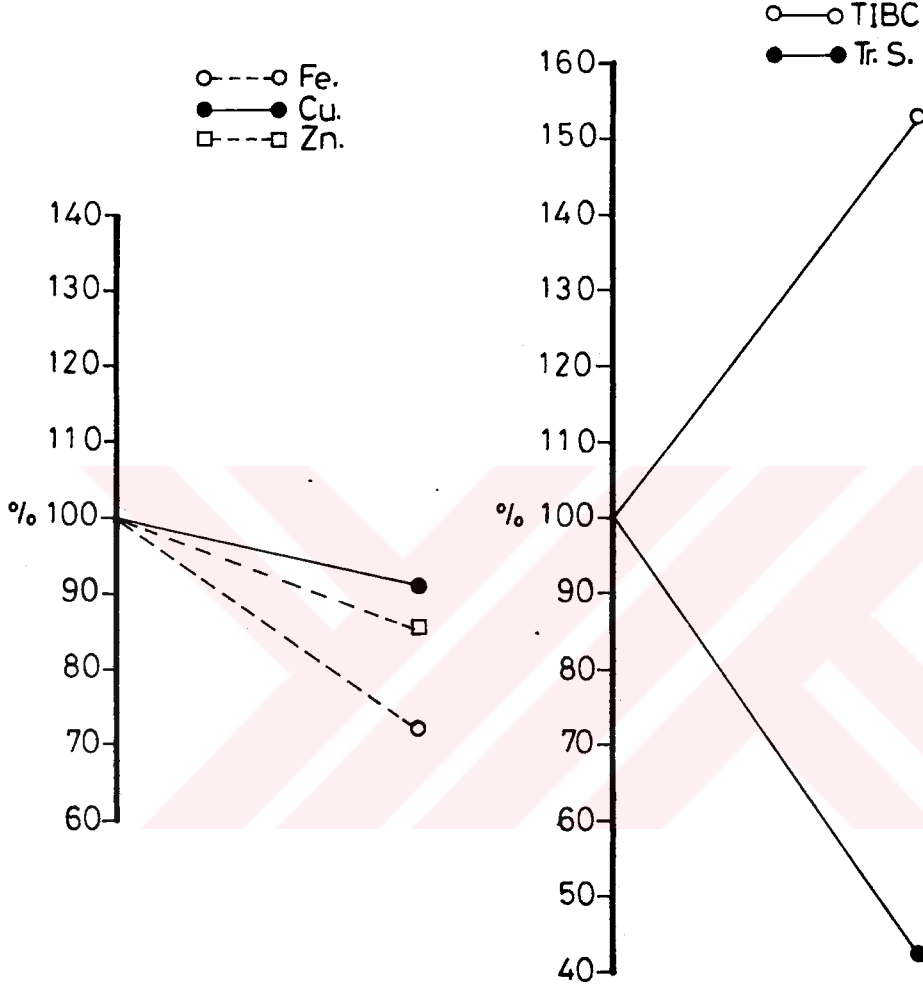


Şekil-8: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra demir, bakır ve çinko değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)'nı; *işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Şekil-9: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra TIBC ve Tr.S. değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)'nı; *işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Aynı şekilde, transferrin saturasyonunun (%Tr.S.) polisitemik grupta kontrol değere göre daha düşük olmasına karşın, serum total demir bağlama kapasitesi (T.I.B.C.) yüksektir (Tablo:2, Şekil:9).



Şekil-10: Polisitemik grupta, kontrol (inisyal) değerlere göre belirtilen parametrelere ait ortalama değerlerde meydana gelen % değişimler. (Kontrol değerlerin ortalamaları %100 olarak kabul edilmiştir).

Gerek eser elementlerin gerekse serum total demir bağlama kapasitesi ile transferrin saturasyonu değerlerinin polisitemik grupta kontrol değerlere göre ne oranlarda farklı olduklarını saptamak amacıyla yapılan incelemelerde, kronik hipoksik hipoksinin etkisiyle oluşturulan

polisitemide demirin %27.5, bakırın %9.3, çinkonun %13.8, transferrin satürasyonunun %57.2 oranlarında daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil:10). Buna karşı serum total demir bağlama kapasitesinin polisitemik grupta kontrol değere göre %53 oranında daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil:10).



TARTIŞMA

Organizmanın oksijene olan gereksinmesinin arttığı hallerde, eritropoietik faaliyetin hızlandığı çoktan beri bilinir (25,26). Nitekim, deneysel olarak oluşturulan veya patolojik nedenlerle ortaya çıkan bazı hipoksik durumlarda, genellikle kemik ilikte kan yapımının hızlanmasıyla beraber kanda retikülositoz gözlenir (26,76,84). Bu çalışmadan kazanılan bulgular, bu genel görüşü desteklemekte ve ayrıca eser elementlerin eritropoez düzenleme mekanizmasındaki rollerini bir dereceye kadar açıklığa kavuşturmuştur.

550 saat (yaklaşık 23 gün), hergün 22 saat olmak üzere, 340 torr basınçta bırakılarak polisitemi oluşturulan tavşanlarda, % hemotokrit değeri, eritrosit sayısı hemoglobin konsantrasyonu, retikülosit sayısı değerleri normoksik koşullarda elde edilen kontrol değerlerden yüksek bulunmuştur. Gerek bu bulgular gerekse M.C.H. ve M.C.H.C. değerlerinin polisitemik grupta kontrol değerlere göre daha düşük olması, oldukça uzun süreli kronik hipoksik hipoksinin etkisiyle kemik ilikte eritropoietik faaliyetin hızlandığını kanıtlar.

Bilindiği gibi, kemik iliğinde yeni oluşup dolaşım sistemine katılan eritrositler hipokrom mikrositer tiptedir. Her ne kadar bizim çalışmamızda M.C.H. ve M.C.H.C. değerlerinin polisitemik grupta düşük olması, eritrosit hücrelerinin hipokrom olduğunu kanıtlıyor ise de, M.C.V.'nin kontrol değerlere göre az anlamlı dahi olsa yüksek bulunması çelişkili gibi görülebilir. Ancak, hayvanların nispeten uzun bir süre düşük basınçta bırakıldıkları gözönüne alınırsa, bu

süre içinde ilk oluşan hücrelerin hacimlerinin zamanla arttıkları, çoğunluğunun normo-veya makrositer tipe dönüştükleri düşünülebilir.

Kronik veya nispeten uzun süreli akut hipoksinin etkisiyle eritropoezin hızlanmasının nedeni birçok araştırmacılarla incelenmiş; eritropoietin veya eritropoietik stimulan faktör denilen, renal veya ekstrarenal dokulardan salgılanan humoral bir maddenin kemik iliğini stimule ettiği kesinleşmiştir (9,13,21,27,31,34,43,46,51,73,86,90,101).

Bu çalışmaların çoğunda, deney hayvanlarında anemik veya hipoksik hipoksi oluşturulmuş; bunlardan elde edilen plazma veya plazma ekstralarının ikinci bir grup hayvana injeksiyonunda eritropoezin hızlandığı gösterilmiştir (9, 21,27,28,31,34,43,46,51,88,90,101).

Burada, üzerinde önemli durulması gereken bir husus, hipoksik hipoksinin etkisiyle eritropoietinin oldukça kısa bir sürede salgılanmasıdır. Nitekim, Schooley et al. (77), bir grup sıçanı 2 saat süre ile 321 torr basınçta hipoksik hipoksiye tabi tutmuşlar; 4. saatte hematokrit değerinin %60'a yükseldiğini; eritropoietin düzeyinin en yüksek değere ulaştığını göstermişlerdir. Çavuşoğlu et al. (22), renal arter stenozlu tavşanları, günde 6 saatten toplam 30-31 saat, 400 torrluk bir basınçta bulundurmışlardır; bu hayvanlardan elde edilen plazma örneklerini assay sıçanlara injekte ettiklerinde, eritropoezin hızlandığını kanıtlamışlardır. Yiğit et al. (101) ise, tavşanlarda glomus caroticum, dalak ve karaciğeri hipoksik kanla perfüze ettiklerinde, perfüzyon başlangıcından 3 saat sonra bu dokulardan eritropoietinin salgılandığını, perfüzatı assay sıçanlara injekte etmek suretiyle göstermişlerdir. Şu halde, hipoksi eritropoietinin kaynağı olan renal ve ekstrarenal dokulara çok kısa zamanda etki ediyor; humoral maddenin sentez ve/veya salgılanmasını sağlıyor.

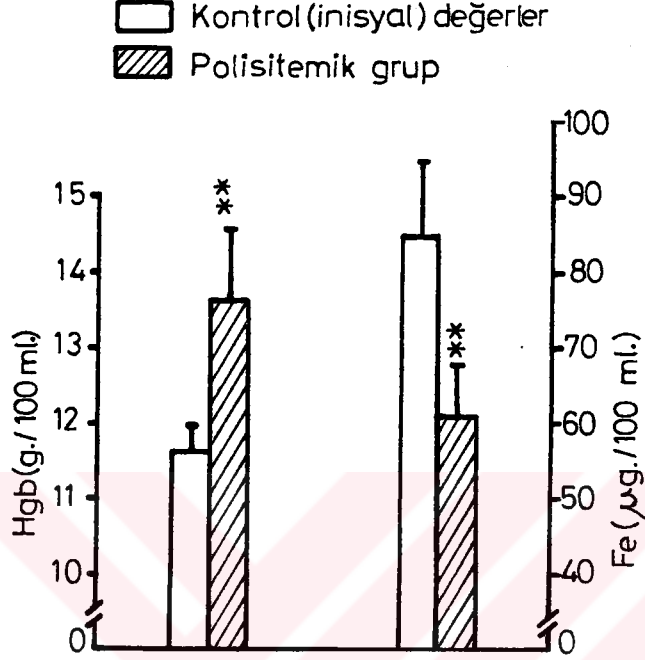
Böbrekten salgılanan renal eritropoietik faktörün (REF) aktif olmadığı, ya plazmada bir taşıyıcı ile birleşerek aktif hale geçtiği veyahutta gene plazmada bir taşıyıcı ile birleşerek aktif hale geçtiği veyahutta gene bulunan protein niteliğindeki bir substratı aktif hale, eritropoietik stimulan faktöre (ESF) çevirdiği Gordon ve Zanjani (34) tarafından ileri sürülmüştür. Yiğit et al. (101), karaciğerin hipoksik kanla perfüzyonu deneylerinin bulgularına dayanarak, bu dokudan salgılanan hepatik faktörün inaktif olduğunu, belki de REF ile aktive edildiğini zannetmektedirler.

Yukarıda özetlenen çalışmaların ışığı altında, bizim çalışmamızda uygulanan yöntemle eritropoietik faaliyetin hızlanması ve dolayısıyla polisiteminin oluşması, hipoksinin etkisiyle gerek renal gerekse ekstrarenal dokulardan eritropoietik stimulan faktörün salgılanmasından dolayıdır. Bu humoral madde, plazmada, bahsettiğimiz mekanizmalarla aktif hale geçer ve kemik iliğini uyarır. Benzer bir mekanizmanın deniz düzeyinde belli yüksekliklere çıkan ve buralarda bir süre ikamet eden kişilerde de vukubulduğundan "Genel Bilgiler" bölümümüzde bahsettik.

Şimdi de, bulgularımızın ve konu ile ilgili diğer çalışmaların ışığı altında, eser elementlerin eritropoez stimülasyon mekanizmasındaki muhtemel rollerini inceleyelim.

Organizmada demir, hemen hemen yalnızca hücresel solunum olaylarında rol oynar. Demir, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin olduğu gibi, hemoglobin, miyoglobin ve sitokromun da önemli bir komponentidir (39). Demir içeren elektron taşıyıcıları (özellikle sitokromlar) bütün hücrelerde bulunur ve hücre içi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının çoğunda önemli rol oynar. Şöyle ki, (Fe^{++}) yokluğunda yaşam birkaç saniyede sona erebilir (37).

Çalışmamızda, polisitemik grupta serum demirinin kontrol değere göre daha düşük olduğu saptanmış; hemoglobin konsantrasyonu ise daha yüksek bulunmuştur (Şekil:11).



Şekil-11: Kronik hipoksik hipoksi etkisiyle oluşturulan polisitemiden önce ve sonra hemoglobin ve demir değişimleri. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart hatası (S.E.)'ni; *işareti kontrol (inisyal) değerlere göre istatistiksel anlamlılığı belirtmektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Bu bulgular, hipoksik hipoksi etkisiyle eritropoietik faaliyetin hızlanması ve dolayısıyla hemoglobin sentezinin artması sonucunda, hemoglobinin enzimatik bir komponenti olan demirin fazladan kullanıldığını kanıtlar. Nitekim, eritropoezin hızlandığı hallerde, plazma demir konsantrasyonunun azaldığı çoktanberi bilinir. Ancak, deney koşullarımızda sadece serum demir miktarının ölçümünün demir metabolizması hakkında yeterli bilgi vermeyeceği gerekçesiyle, demir bağlama kapasitesi (T.I.B.C.) ile % transferrin saturasyonu da tayin edildi. Bulgularımıza göre, polisitemik

grupta TIBC'nin kontrol değerden çok daha yüksek olduğu saptanmış; % transferrin satürasyonu ise düşük bulunmuştur.

Bulgularımız, bir taraftan serum demiri ile % transferrin satürasyonu arasında pozitif; diğer taraftan serum demiri ile T.I.B.C. arasında negatif birer ilişkinin bulunduğu hususundaki görüşleri desteklemektedir (6,33,65).

Plazmada bir β -globulin olan transferrinin her bir molekülü reversibl olarak 2 Fe^{+3} iyonu ile birleşir ve bu suretle demir-transferrin kompleksi oluşur. Hemoglobinin yapıldığı hücrelere (normoblastlar) demir bu kompleksten sağlanır ve hücrelere geçişinde ferröz haline indirgenir (45). Şu halde, bizim deneylerimizdeki gibi hipoksinin etkisiyle eritropoezin hızlanması ve dolayısıyla hemoglobin sentezinin artması sonucunda, plazma demiri transferrine bağlı olarak hemoglobinin yapıldığı hücrelere taşınacak; plazmadaki serbest demir miktarı ve transferrin satürasyonu azalacaktır. Organizmada demire gereksinmenin fazla ve besinlerle alınan demirin yeterli olduğu hallerde, total demir bağlama kapasitesinde bir artma gözlenecektir. Nitekim, bulgularımız bu görüşe uymaktadır.

Organizmada demir bir de ayrıca plazmada ferritin halinde bulunur, gerçekte, ferritin vücuttaki demir depoları hakkında daha iyi bir fikir verir (45). Ancak, radioimmunoassay tekniği ile yapılan ölçümlerde güvenilir sonuçlar her zaman elde edilemediğinden, demir metabolizmasının incelenmesinde bazen bu parametrenin tayini araştırmanın kapsamı dışında bırakılır. Nitekim, Pilon *et al.* (69), sağlıklı kişilerde yaptıkları bir çalışmada T.I.B.C., % Tr.S. ve serum demiri ile serum ferritinini karşılaştırarak demir metabolizmasını yalnızca ferritinle, bir parametre halinde ifade etmeyi amaçlamışlardır. Ancak, serum ferritin düzeylerinin günlük ölçümlerde fazla farklılık göstermemesinden dolayı, bu parametrenin diğer parametrelerle birlikte saptanmasıyla daha kesin bir karara varılacağını belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi, Çavdar et al.(18) de demir metabolizmasının saptanmasında serum demir miktarını, T.I.B.C.'yi ve % transferrin saturasyonunu tayin etmişlerdir. Kent ve kırsal kesim çocuklarında yaptıkları bu çalışmada, eritrositer parametrelere göre sadece %10 oranında anemi insidansı saptarken, aynı kişilerde serum demiri, T.I.B.C. ve transferrin saturasyonu tayin edildiğinde, insidansın 3 kat daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir.

Memeli hayvanlarda bakır, demirin barsak kanalından absorpsiyonunu, mobilizasyonunu ve dokularda kullanımına etki ederek hemoglobin sentezinde rol oynar. Plazmada bulunan bakırın %90'ı serüloplazmin şeklindedir. Serüloplazmin özellikle demirin hücrelerden plazmaya geçişinde çok önemli bir rol oynar. Bilindiği gibi, hemoglobinin pigmenti olan hem, protoporfirin ile Fe^{+2} iyonunun birleşiminden oluşur. Bu aşamada bakırlı enzim olan sitokrom oksidaz $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ redüksiyonunu sağlar (65).

Yukarıda verilen bilgiye göre, bizim çalışmamızda polisitemik grubun serum bakırının kontrol değerden düşük olması şöyle açıklanabilir; polisitemik grupta hemoglobin sentezi artmış ve dolayısıyla hem yapımına etki eden, yukarıda kaydedilen reaksiyonlar da hızlanmıştır. Sonuç itibariyle serüloplazminden bakır mobilize olacak ve enzimatik aktivitesi artmış olan sitokrom oksidaza bağlanacaktır.

Çalışmamızda, polisitemik hayvanlarda serum çinko düzeyinin kontrol değerine göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, düşük basınçta tüm metabolik faaliyetin artması ve bu arada eritropoezin hızlanmasıyla beraber, enzimatik reaksiyonlarda önemli olan çinkonun kullanımının artmasından dolayı olabilir. Zira, tüm eser elementler gibi, çinkonun da enzimatik reaksiyonlarda rol oynadığını kanıtlayan tanılar, özellikle son zamanlarda

yapılan çalışmalardan kazanılmıştır. Şimdi de bu çalışmaların bazılarını kısaca özetleyelim.

Çinko da, demir ve bakır gibi birçok metallo-enzimlerin yapısında bulunur. Çinkolu enzimlerin çoğunun aktiviteleri çinko eksikliğinden etkilenirler. Nitekim, çinko-dan fakir diyetle beslenen deney hayvanlarında, alkali fosfataz, karboksipeptidaz ve timidinkinaz enzimlerinin aktivitelerinin 3-6 gün içinde azaldığı gösterilmiştir (66).

Brewer et al. (11), hücre içi aşırı kalsiyum birikmesinin neden olduğu orak hücre anemisinin, çinko-kalsiyum antagonizmi ile tedavi edilebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, membran stabilizasyonunun sağlanmasında, çinko içeren ilaçların önemli bir yeri olduğu kanıtlanmıştır.

Çavdar et al. (17), çinko ve demir emiliminin jeofajya'da anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılara göre, pikalı hastalarda hipogonadizm ve büyüme bozukluğu tedavisinde yalnızca demir yerine, demirle birlikte çinko verilmesi daha etkilidir.

Crofton et al. (15), malnütrisyonunda ve gebelere tedavi amacıyla mineral verildiğinde, Fe/Zn oranının azalmasıyla demirin absorpsiyonunun azaldığını saptamışlardır.

Danford et al. (24), zeka geriliği gösteren pikalı hastaları, pikasız hasta grubu ile karşılaştırdıklarında, plazma çinko düzeylerinin azalmış, plazma bakır seviyelerinin ise yükselmiş olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılara göre, plazmada çinko ile demir arasında pozitif; çinko ile bakır arasında ise negatif bir ilişki vardır. Bu ilişki, çinkonun, demir, bakır ve kalsiyumla olan rekabet özelliği ile ilgilidir. Ayrıca, tedavi amacıyla kullanılan çinkonun, hipokupremi oluşturduğu bilinmektedir (66). Hücre membranlarında, çinko ile kalsiyum arasındaki rekabet

nedeniyle ve bazı hastalıklarda (Wilson hast.), bakır emilimini azaltıcı etkisi dolayısıyla çinko içeren ilaçların tedavi edici ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir (11).

Sonuç olarak, bu çalışmaların ışığı altında, araştırmamızda tavşanların nispeten uzun bir süre düşük basınçta bulundurulmasıyla oluşturulan polisitemi ile beraber, plazmada eser elementlerin azalması açıklanabilir. Şöyle ki, hızlanan eritropoietik faaliyet ile beraber hemoglobinin sentezi artmakta, bu amaçla daha fazla demir kullanılmakta; demirin gerek absorpsiyonu gerekse mobilizasyon ve kullanımında vukubulan enzimatik reaksiyonlarda bakır ve çinko gibi eser elementlere fazladan ihtiyaç hasıl olmaktadır. Sonuç itibariyle, eser elementlerin plazmadaki miktarları da azalmaktadır. Şu halde, herhangi bir nedenle eritropoietik faaliyetin hızlanmasında veya bazı anemi türlerinin tedavisinde, demirle beraber diğer eser elementlerin de verilmesi gereklidir. Ancak, çeşitli eser elementlerin ne gibi enzimatik reaksiyonlarda rol oynadıklarını kesinlikle saptamak için, hücre düzeyinde yeni çalışmaların yapılması gerekir.

Ö Z E T

Araştırmamızda, eser elementlerin eritropoez düzenleme mekanizması ile olan muhtemel ilişkilerini açıklayabilmek amacıyla, bir grup albino tavşan 23 gün süre ile, hergün 22 saat olmak üzere, toplam 550 saat düşük basınç kamarasında 340 torr basınçta bulunduruldu. Bu suretle uygulanan aralıklı kronik hipoksik hipoksi etkisiyle hayvanlarda polisitemi oluşturuldu. Polisitemik grup diye adlandırılan bu serideki hayvanların çeşitli eritrositer parametreleri, düşük basınç kamarasına konmadan önce elde edilen inisyal (kontrol) değerler ile karşılaştırıldı; aradaki farkların istatistiksel anlamlılığı saptandı.

Ayrıca, kanda üç eser elementin, demir, bakır ve çinkonun miktarları ile yüzde transferrin saturasyonu ve total demir bağlama kapasitesi (T.I.B.C.) tayin edildi; polisitemik grup ile inisyal (kontrol) değerler arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı hesaplandı.

Polisitemik grupta, % hematokrit değerleri, hemoglobin konsantrasyonu, eritrosit ve retikülosit sayıları inisyal (kontrol) değerlerden anlamlı derecede yüksek bulundu. M.C.V. değerlerinin az anlamlı olarak daha yüksek; M.C.H. ve M.C.H.C. değerlerinin ise, çok anlamlı olarak düşük oldukları kaydedildi.

Polisitemik grupta her üç eser elementin, sırasıyla demir, bakır ve çinkonun kandaki miktarlarının inisyal (kontrol) değerlerden daha düşük olduğu saptandı. T.I.B.C. değerinin çok anlamlı olarak yüksek ve % transferrin saturasyonunun ise, anlamlı derecede düşük olduğu kaydedildi.

Bu çalışmadan elde edilen tüm bulguların beraberce değerlendirilmesinde; kronik hipoksik hipoksinin etkisiyle eritropoietik faaliyetin hızlanmasıyla beraber hemoglobin sentezinin arttığı, fazladan demirin kullanıldığı; demirin gerek absorpsiyon gerekse mobilizasyon ve kullanımında vukubulan enzimatik reaksiyonlarda bakır ve inko kullanımının arttığı sonucuna varılabilir.



S U M M A R Y

In this study, the role of trace elements in the mechanism of erythropoiesis was investigated in albino rabbits, subjected to chronic hypoxic hypoxia. The animals were exposed in an altitude chamber to a barometric pressure of 340 torr daily for 22 hours, for a total of 550 hours or circa 23 days.

The various erythrocytic parameters and the levels of iron, copper and zinc in blood as well as percentage transferrin saturation and total iron binding capacity (T.I.B.C.) were determined, before and following exposure to chronic hypoxic hypoxia. For purposes of comparison, the initial data were referred to as the control, while those obtained following exposure to low atmospheric pressure as the polycythemic groups. The data were statistically treated.

The percentage hematocrit, hemoglobin concentration, red blood and reticulocyte counts following exposure to chronic hypoxic hypoxia were found to be higher than the corresponding initial, pre-hypoxic values. Although the mean value for M.C.V. was found to be increased upon the induction of polycythemia, the difference between the means of pre-and post-hypoxic values was on the borderline of statistical significance. On the other hand, M.C.H. and M.C.H.C. in the polycythemic group were significantly lower than the corresponding initial, control values.

Similarly, the levels of iron, copper and zinc in the blood obtained from the polycythemic rabbits were significantly lower than the corresponding initial, control values, T.I.B.C. was found to be significantly increased while percentage transferrin saturation decreased upon exposure of animals to low barometric pressure.

The results of this study, taken as a whole, suggest that as an outcome of the stimulation of erythropoiesis in chronic hypoxic hypoxia, iron turnover rate is accelerated and consequently hemoglobin synthesis is increased. It is possible that trace elements, such as copper and zinc, play important roles in the enzymatic reactions involved in the processes of absorption, mobilization and utilization of iron and consequently in the proper functioning of erythropoietic mechanisms.

Ö Z G E Ç M İ S

1952 yılında Değirmendere-KOCAELİ'de doğdum. İlk-
okulu Değirmendere ilkokulunda, orta öğrenimimi Özel Ye-
şilyurt Kolejinde ve Haydarpaşa Lisesinde tamamlayıp
1970 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik-
Kimya bölümüne kaydoldum. Mezun olmadan İstanbul Üniver-
sitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Biofizik
Kürsüsüne laborant olarak girdim. 1976 yılında mezun ol-
dum ve aynı kürsüde Biolog olarak görev aldım. 1983 yılın-
da öğretim üyesi yardımcısı oldum. Halen bu görevime devam
etmekteyim. Evliyim ve iki çocuğum var.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yakın ilgi ile izleyen ve geniş olanaklar içinde çalışmamı sağlayan, derin bilgi, olumlu eleştirileri ve uyarılarıyla beni yönlendiren değerli hocam, Sayın Prof. Dr. MELİHA TERZİOĞLU'na minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Çalışmalarımda kıymetli yardımlarını ve yakın alakalarını gördüğüm Sayın hocam Doç. Dr. GÜNNUR YİĞİT ve Doç. Dr. SİNAN ÖNEN ile diğer hocalarıma ve bütün kürsü arkadaşlarıma teşekkür borçluyum.

Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinin kullanılmasında gösterdikleri yardımlarından dolayı Ç.N.A.E.M. Kimya bölümünden başta Dr. YILMAZ ERKOL'a ve diğer görevlilere, şekil ve tabloların çiziminde gerekli titiz çalışmayı gösteren Ressam NECATİ ÇEKEN'e ve yardımlarını gördüğüm personelimize teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Aktulga, A., Ulutin, O.: Normal insan trombositlerinin çinko değerleri ile ilgili bir çalışma. TÜBİTAK IV. Bilim Kong. s.: 1-4, Ankara, 1973.
2. Anand, V.D., White, J.M., and Nino, H.V.: Some aspects of specimen collection and stability in trace element analysis of body fluids. Clin. Chem. 21, 4, 595-602, 1975.
3. Archer, R.K.: Haematological techniques for use on animals. p.70-71, Blackwell scientific publications, Oxford, 1965.
4. Barcroft, J., Binger, C., Bock, A.V., Dogart, J.H., Forbes, H.S., Harrop, G., Meakins, J.C. and Redfield, A.C.: Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B211, 351, 1923. 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.

12. Burch, R.E., Kahn, H.K.J., and Sullivan, J.F.: Newer aspects of the roles of Zn, Mn, and Cu in human nutrition. Clin. Chem. 21, 4, p:501-520, 1975.
13. Carnot, P., Déflandre, C.: Sur L'activité hémopoiétique des différents organes au cours de la régénération du sang. Compt. rend. 143: 432, 1906. 86 no'lu kaynakta site edilmiştir.
14. Carrico, R.J. and Deutsch, H.F.: Isolation of human hepatocuprein and cerebrocuprein. Their identity with erythrocuprein. In: Keinhold, J.G.: Trace elements.. elements. Clin. Chem. 21,4, 476-500, 1975 .
15. Crofton, R.W., Gvozdanovic, S., Gvozdanovic, D., Aggett, P.J.: The effect of zinc on the intestinal absorbtion of anorganic iron in man. International symposium on zinc deficiency. Abstracts. P.:8, Ankara, 1982 .
16. Çağlar, M.K.: Demir eksikliği ve anemisi. Katkı, 3, 9,2, 1025-1046, 1982 .
17. Çavdar, A.O., Arcasoy, A., Cin, Ş., Babacan, E., Gözdaşoğlu, S., Erten, J., Doğru, Ü., Ertem, U., Gümüş, H., Uysal, Z.: Zinc deficiency in Turkey. International symposium on zinc deficiency. Abstracts. p.: 6-7, Ankara, 1982 .
18. Çavdar, A.O., Arcasoy, A., Gözdaşoğlu, S.: Köy ve şehir, çocuk ve adölesanslarında hemoglobin, hematokrit ve "trace" minerallerin incelenmesi. TÜBİTAK IV, Bilim Kong. s.: 1-5 Ankara, 1973 .
19. Çavdar, A., Arcasoy, A., Gözdaşoğlu, S., Cin, Ş., Erten, İ.: Türk çocuk ve gençlerinde anemi oranı, demir eksikliği ve iz elementler. Doğa bilim dergisi, 1,4, 135-136, 1977.
20. Çavuşoğlu, H.: Genel hipoksik hipokside, normal ve denerve tavşanların parsiyel stenozlu böbreğinde eritropoietin yapım mekanizması hakkında. Tıp Fak. Mec. (İstanbul). 34: 1-42, 1971 . 46 no'lu kaynakta site edilmiştir.
21. Çavuşoğlu, H., Kayserilioğlu, A. and Terzioğlu, M.:The effects of general hypoxic hypoxia and renal ischemia on erythropoietin production Arch. Internat. Physiol. Biochim., 77, 260-274, 1969 .
22. Çavuşoğlu, H., Kayserilioğlu, A. and Terzioğlu M.: The relation of the severity of general hypoxic hypoxia to erythropoietin liberation in partial renal ischemia. New Istanbul Contr. Clin. Sc. 10, 79-95, 1972 .
23. De Gruchy, G.C.: Clinical Haematology In Medical Practice. Second Ed. p.: 428, 77-79, Blackwell Sci. Pub., 1964 .

24. Danford, D.E., Smith, J.C., Huber, A.M.: Pica and zinc. International symposium on zinc deficiency. Abstracts. p.: 16, Ankara, 1982 .
25. Eaton, J.W.: Low altitude hominids at high altitude. A commentary. Blood Cells,7:509-511, 1981 .
26. Erslev, A.J.: Erythroid adaptation to altitude. Blood Cells,7: 495-508, 1981 .
27. Erslev, A.J.: Erythropoietic factor in the control of red cell production. Ann. N.Y. Acad. Sci. 70: 627,1959.
28. Erslev, A.J.: Observations on the nature of the erythropoietic serum factor. II. Erythropoietic activity of serum and bone marrow after time limited exposure to anemic and hypoxic anoxia. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. St. Louis. 50,4,543-549, 1957 .
29. Frankel, S., Reitman, S., Sonnenwirth, A.C.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Vol.: I, p.:204-208, 436-450, 7. ed., Mosby, 1970.
30. Fredericq, 1878. 65 no'lu kaynakta site edilmiştir.
31. Fried, W., Kilbridge, T., Krantz, S., McDonald, T.P., Lange, R.D.: Studies on extra-renal erythropoietin. J. Lab. Clin. Med. 73: 244, 1969. 86 no'lu kaynakta site edilmiştir.
32. Ganong, W.F.: Review of Medical Physiology. p.: 523, 10.th edition, Lange Medical Publications, Los Altos, California, 1981.
33. Gedikoğlu, G., Sidal, M., Koç, L., Devecioğlu, O., Çakıroğlu, S. and Özmen, Y.: The serum ferritin levels in iron deficiency anemia before and after treatment in 228 cases. International Symposia. Abstract book. Istanbul, 1981 .
34. Gordon, A.S., Zanjani, E.D.: Mechanism of erythropoietin production. Israel. J. Med. Sci. 7: 963, 1971. 86 no'lu kaynakta site edilmiştir.
35. Goyer, A.G., and Mehlman, M.A.: Toxicology of trace elements. p.: 60,61 Halsted press, New York, 1977.
36. Guyton, A.C.: Fizyoloji, cilt I. (Çeviri) s.: 92,96-99, 235. Güven Kitabevi, Ankara, 1977 .
37. Guyton, A.C.: Fizyoloji. cilt III. (Çeviri). s.: 295. Güven Kitabevi, Ankara, 1978 .

38. Hahn, P.F., Bale, W.F., Ross, J.F., Balfour, W.M. and Whipple, G.H.: Radioactive iron absorption in gastrointestinal tract: Influence of anemia, anoxia and antecedent feeding distribution in growing dogs. J. Exp. Med. 78, 169-188, 1943 . 65 no'lu kaynakta site edilmiştir.
39. Harper, A.H.: Fizyolojik Kimyaya Bakış (Çeviri), s.:554-576. Ege Üniv. Matbaası. İzmir ,1976 .
40. Hart, E.B., Steenbock, H., Waddell, J. and Elvehjem, C.A.: Iron in nutrition: Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. J. Biol. Chem. 77, 797-812, 1928 . 65 no'lu kaynakta site edilmiştir.
41. Huebers, H.A., Huebers, E., Csiba, E., Rummel, W. and Finch, C.A.: The significance of transferrin for intestinal iron absorption. Blood, 61, 2, 1983 .
42. Hurtado, A., Merino, C.F. and Delgado, E.: A.M.A. Arch. Internal Med. 75, 284, 1945 . 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.
43. Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Gurney, C.W., Fried, W. and Plzak, L.: Studies of erythropoietin: The hormone regulating red cell production. Ann. N.Y. Acad. Sci. 77: 551-573. 1959 . 86 no'lu kaynakta site edilmiştir.
44. Kayserilioğlu, A.: Böbreğin eritropoietin teşekkülü ile ilgisi. Tıp Fak. Mec. (İstanbul). Monog. s.:44, 1968 . 46 no'lu kaynakta site edilmiştir.
45. Keele, C.A., Neil, E. and Joels, N.: Samson Wright's Applied Physiology. Thirteenth edition. p.42. Oxford University Press. Oxford. 1982.
46. Khraisha, S.: Kronik hipoksik hipokside ekstrarenal eritropoietin yapımı. (Doktora tezi). Matematik Araştırma Enstitüsü Matbaası. İstanbul,1976.
47. King, J.S.: A burgeoning branch of clinical analysis. Clin. Chem. 21,4,467, 1975.
48. Kuş, Ş., Yüreğir, G., Necipoğlu, Z., Donma, O.: Serumda Ca, Mg, Fe, Zn ve Cu'nun A.A.S. ile analizi. Biyokimya dergisi, 4, 1, 20-32, 1980.
49. Lawrence, J.H., Huff, R.L., Siri, W.E., Wasserman, L.R. and Hennessy, T.G.: Acta Med. Scand. 142, 117, 1952 . 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.
50. Lehninger, A.L.: Biochemistry, p.: 183-185, Second ed. Worth publishers inc. New York, 1977.

51. Linman, J.W., Korst, D.R., Bethell, F.H.: Some observations on the stimulation of erythropoiesis by humoral factors Ann. N.Y. Acad. Sci. 70: 638, 1959. 86 no'lu kaynakta site edilmiştir.
52. Mackellar, W.C. and Crane, F.L.: Iron and copper in plasma membranes. J. Bioenergetics and Biomembranes, 14, 4, 1982 .
53. Mazur, A. and Harrow, B.: Textbook of Biochemistry p.: 599, 10.th. ed., Saunders company, Philadelphia, 1971 .
54. Monge, C.: A.M.A. Arch. Internal Med. 59, 32, 1937 . 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.
55. Moody, J.R.: The sampling, handling and storage of materials for trace analysis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. 305, 669-680, 1982 .
56. Moody, J.R.: Sampling and storage of materials for trace elemental analysis. Trends in Analytical Chemistry. 2,5, p.: 116-118, 1983 .
57. Mylrea, K.C. and Abbrecht, P.H.: Hematologic responses of mice subjected to continuous hypoxia. Am. Jour. of Physiol. 218, 4, 1145-1149 , 1970 .
58. Naughton, B.A., Gordon, A.S., Piliero, S.J. and Liu, P.: Extrarenal erythropoietin. p.: 194-217. In: In vitro aspects of erythropoiesis. (M. Murphy ed.) Springer-Verlag, New York. 1978.
59. O'Dell, B.L.: Biochemistry and physiology of copper in vertebrates. In: Trace elements in human health and disease, p. 391-413, Vol.I (A.S. Prasad, ed.) Academic Press, New York , 1976 .
60. ODell, B.L.: Metabolic functions of zinc - A new look. In: Trace element metabolism in man and animals. (J.M. Gawthorne, J. McC. Howell, C.L. White ed.). p. 319-326, Springer-Verlag, Berlin , 1982 .
61. Olson, A.D., and Hamling, W.B.: A new method for serum iron and TIBC by A.A.S. Clin. Chem. 15, 438-444, 1969.
62. Orten, J.M.: Biochemical aspects of zinc metabolism. In: Zinc metabolism. (A.S. Prasad ed.) p. 38-47, Springfield-Illinois, U.S.A., 1966 .
63. Perkin-Elmer: Determination of Fe, Cu, Zn in serum, BC-2, in clinical method of atomic absorption spectroscopy, ed. by Perkin-Elmer Corp. Norwalk, Connecticut, 1974 .

64. Peter, F., and Wang, S.: Serum Fe and TIBC compared with serum ferritin in assessment of Fe deficiency. Clin. Chem. 27, 2, 276-279, 1981.
65. Prasad, A.S.: Trace elements and iron in human metabolism. p.: 88, 289-303. John Wiley and Sons. Ltd. Great Britain. 1978 .
66. Prasad, A.S.: Zinc deficiency in human subjects. International symposium on zinc deficiency. Abstracts. p.: 1-2, Ankara, 1982 .
67. Prasad, A.S., Halsted, J.A. and Nadimi, M.: Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia, p:532-546 In: Trace elements and iron in human metabolism. (A.S. Prasad ed.) John Wiley and Sons Ltd. Great Britain, 1978 .
68. Prasad, A.S., Schoemaker, E.B., Ortega, J., Brewer, G.J., Oberleas, D. and Oelshlegel, F.J.: Zinc deficiency in sickle cell disease. Clin. Chem. 21, 4, 582-587, 1975 .
69. Pilon, V.A., Howanitz, P.J., Howanitz, J.H. and Domres, N.: Day-to-day Variation in serum ferritin concentration in healthy subjects. Clin. Chem. 27,1, 78-82, 1981 .
70. Raulin, J.: Études cliniques sur la végétation. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 11,93,1869. In: Trace elements and iron in human metabolism. (A.S. Prasad. ed.) John Wiley and Sons Ltd., Great Britain, 1978 .
71. Reimann, F.: Wachstumsanomalien und Missbildungen bei Eisenmangelzuständen (Asiderosen). p. 546-550. In: Trace elements and iron in human metabolism. (A.S. Prasad ed.) John Wiley and Sons Ltd. Great Britain, 1978 .
72. Reinhold, J.G.: Trace elements-A Selective Survey. Clin. Chem. 21, 4, 476-500, 1975 .
73. Reynafarje, C. The influence of high altitude on erythropoietic activity. Homeostatic Mechanisms, Brookhaven Symposia in Biology: No: 10, 132-146, 1957 .
74. Rosenthal, R., and Blackburn, A.: Higher copper concentrations in serum than in plasma. Clin. Chem. 20,9,1974.
75. Roth, H.P. and Kirchgessner, M.: Nutritional Zn deficiency and metabolism of insulin and growth hormone. In: Trace element metabolisms in man and animals. (J.M. Gawthorne, J. McC., Howell, C.L. White ed.) p. 334-337. Springer-Verlag, Berlin, 1982 .

76. Rouing, P.J.E., Veeger, W., Vegter, J.J.M., Woldring, M.G., Sluiter, H.J., Tammeling, G.J., Nieweg, H.O. and Orie, N.G.M.: Hypoxemia-erythropoiesis and hemolysis. Med. Thorac. 19: 26-53, 1962 .
77. Schooley, J.C., Mahlmann, L.J.: Evidence for the de novo synthesis of erythropoietin in hypoxic rats. Blood, 40: 5, 662-670, 1972 .
78. Schroeder, H.A., and Nason, A.P.: Trace element analysis in clinical chemistry. Clin. Chem. 17, 6, 461-474, 1971.
79. Slavin, W.: Atomic absorbtion spectroscopy. p. 197. The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut, 1968 .
80. Stohlman, F. and Brecher, G.: Humoral regulation of erythropoiesis. V. Relationship of plasma erythropoietin level to bone marrow activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 40-43, 1959 .
81. Stryer, L.: Biochemistry. p. 68-72, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1975.
82. Sümbüloğlu, K.: Sağlık bilimlerinde araştırma teknikleri ve istatistik. s.: 97,106,110,124. Çağ Matbaası. Ankara, 1978.
83. Sür, N. : Değişik tedavi yöntemlerine göre sınıflandırılan diabetlilerde serum çinko düzeyleri. (Biyokimya Uzmanlık tezi), İstanbul, 1982 .
84. Şahin, G.: Tavşanda kronik hipoksik hipoksi ile oluşturulan polisitemide 2,3-DPG düzeyi ve akut hipoksik durumda periferik kimoreseptörlerin duyarlılığının incelenmesi (Fizyoloji Doktora Tezi). Cer. Tıp. Fak. Fizyoloji Anabilim Dalı. İstanbul, 1984 .
85. Talbott, J.H. and Dill, D.B.: Am. J. Med. Sci. 192. 626 , 1936 . 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.
86. Terzioğlu, M.: Renal ve ekstrarenal eritropoietin yapımı. Doğa Bilim Dergisi. 1,4,119-128,1977.
87. Terzioğlu, M.: Eritropoez regülasyon mekanizması ve ekstrarenal eritropoietin yapımı hakkında bazı yeni görüşler. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi dergisi. IV, 3, 277-286, 1973.
88. Terzioğlu, M., Sür, A. and Önen, S.: Plasma erythropoietic activity in experimental renal hypoxia and in various blood disorders. Folia Anatomica (suppl.) 2: 7-18, 1975.

89. Terzioğlu, M.: Fizyoloji ders kitabı. II. ş.: 43 Hilâl Matbaası. İstanbul, 1978 .
90. Terzioğlu, M., Süer, A., Önen, S.: Eritropoez regülasyon mekanizmasının incelenmesi: 1. Hipoksik koşullarda, eritropoietin yapımı ile ilgili mekanizmanın araştırılması: TBTAk Tıp Araştırma Grubu Proje No.: TAG-175, İ.Ü: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 1976.
91. Torunoğlu, M.: Eritropoietin. TÜBİTAK "Homeostasis ile ilgili endojen hüморal mekanizmalar" sempozyumu. s.:73-82, Ankara,1979.
92. Underwood, E.J.: Trace elements in human and animal nutrition. p. 56-108. 4.th ed. Academic press, New York, 1977 .
93. Underwood, E.J.: Trace elements in human and animal nutrition. p.:64, 158, 166. Second ed. Academic press. New York, 1962 .
94. Versieck, J., Barbier, F., Speecke, A. and Hoste, J.: Influence of Myocardial infarction on serum manganese, Copper and Zinc Concentrations. Clin. Chem. 21,4,578-581, 1975 .
95. Versieck, J., Barbier, F., Cornelis , R. and Hoste, J.: Sample contamination as a source of error in trace-element analysis of biological samples. Talanta, 29, p. 973-984, 1982.
96. Viault, E.: Comp. rend. 112, 295, 1891. . 73 no'lu kaynakta site edilmiştir.
97. Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. and Rundles, R.W.: Hematology. p. 700, second ed., A Blakiston Publication, New York, 1977.
98. Wintrobe, M.M.: Clinical Hematology. p. 435-436., Sixth ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1967.
99. Wintrobe, M.M., Cartwright, G.E., and Gubler, C.J.: Studies on the function and metabolism of copper. J. Nutr. 50, 395-419, 1953.
100. Yapp, W.B.: An introduction of animal physiology. p.: 84-88. Third edition. Clarendon press. Oxford ,1970 .
101. Yiğit, G., Terzioğlu, M., Khraisha, S.: Extrarenal production of erythropoietin. Haematologica 63,4, 359-374,1978.
102. Yurdakök, M.: Beslenme bozukluklarına bağlı anemiler. Katkı,3, 9,2, 1047-1067, 1982 .
103. Zucali, J.R. and Mirand, E.A.: In vitro aspects of erythropoietin production. p. 218-224. In: In vitro aspects of erythropoiesis (M.Murphy ed.) springer-Verlag, New York, 1978.