Promena sadržaja gvožđa u organima starih pacova

*Determining the level of iron in organs of old rats*Roberto Grujić¹, Bogdan Bjelica¹, Silvio De Luka^{1,2}¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu² Mentor: Institut za patološku fiziologiju „Dr Ljubomir Buba Mihajlović“, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: robertogrujic@gmail.com

Sažetak

Uvod: Gvožđe je esencijalni oligoelement koji je ključan za mnogobrojne fiziološke procese u organizmu. Koncentracija gvožđa u tkivima mora da bude usko regulisana jer je pokazano da veće promene u njegovoj koncentraciji dovode do metaboličkih smetnji i oštećenja tkiva. Starenje je univerzalan i neizbežan fiziološki proces koji dovodi do niza štetnih promena, kao i disbalansa u količini oligoelemenata, najčešće gvožđa. Disbalans gvožđa kod starih osoba je široko rasprostranjen problem, zbog je neophodno ispitati kako starost utiče na distribuciju gvožđa u organizmu.

Cilj: Cilj ovog rada je ispitivanje da li i na koji način starenje utiče na distribuciju gvožđa u pojedinim tkivima (srce, bubreg, testis, jetra, krv) eksperimentalnih životinja.

Materijal i metode: U eksperimentu su korišćene jedinke muškog pola Vistar (Wistar) pacova. Dvadeset životinja je podeljeno u dve grupe: stare i mlade. Obe grupe su brojale po deset jedinki. Nakon dostizanja željene starosti jedinke su žrtvovane u opštoj anesteziji, a njihova tkiva su tretirana u cilju određivanja sadržaja gvožđa u njima.

Rezultati: Ustanovili smo statistički značajan ($p < 0,001$) porast količine gvožđa u tkivu testisa u grupi starih jedinki u odnosu na kontrolnu grupu mladih. Statistički značajan porast ($p < 0,001$) potvrđen je i u bubregu, kao i u krvi ($p < 0,01$). U tkivu jetre i srca pokazana je tendencija ka opadanju količine gvožđa.

Zaključak: U ovom eksperimentu smo dokazali da starost uzrokuje statistički značajno nagomilavanje gvožđa u tkivu testisa, bubrega i krvi, dok količina gvožđa u jetri i srcu pokazuje tendenciju opadanja. Ovakav disbalans gvožđa potencijalno može da dovede do oštećenja ovih tkiva.

Ključne reči: Gvožđe, starost, bubreg, srce, jetra, krv, testis

Uvod

Gvožđe je esencijalni oligoelement koji je bitan za mnogobrojne fiziološke procese u organizmu, prvenstveno za sintezu transportnih proteina, hemoglobina i

Abstract

Introduction: Iron is an essential trace element, vital for numerous physiological processes in the organism. The concentration of iron in tissues must be closely regulated, as it is shown that bigger fluctuations in its concentration could lead to metabolic disturbances and tissue damage. Aging is an universal and inevitable process that leads to a series of adverse changes, as well as imbalances in the amount of trace elements, most often of iron. Iron imbalance in the elderly is a widespread problem, so it is necessary to examine the influence of age on the distribution of iron in the body.

Aim: The aim of this paper is to examine whether and how aging affects the distribution of iron in certain tissues (heart, kidney, testis, liver, blood) in experimental animals.

Material and Methods: We used male Wistar rats in this experiment. Total of twenty animals were divided into two groups: old and young. Both groups consisted of ten animals. After the completion of the experiment, animals were sacrificed under general anesthesia and their tissues were treated in order to determine the iron content in them.

Results: We found a statistically significant increase in the amount of iron in the testicular tissue in the group of old animals ($p < 0.001$), compared to the control group of young mice. Statistically significant increase was also confirmed in the kidney ($p < 0.001$), and in blood ($p < 0.01$). The liver and heart tissue demonstrated a tendency towards decreasing amounts of iron.

Conclusion: In this experiment, we demonstrated that age causes a highly statistically significant accumulation of iron in tissues of the testis, kidney and blood, while the amount of iron in the liver and the heart tends to decrease. This kind of changes can create potentially harmful effects on these tissues.

Key words: Iron, elderly, kidney, heart, liver, blood, testis

mioglobina, a služi i kao kofaktor u mnogim enzimskim reakcijama uključenim u oksidativni metabolizam, DNK sintezu i druge oksidoredukcione procese (1). U telu odraslog čoveka nalazi se približno 3-5 grama gvožđa (45-55 g/mg TM), od čega su dve trećine sastavni deo hemo-

globina eritroidnih prekursora i zrelih eritrocita, dok je ostatak u makrofazima, hepatocitima i drugim ćelijama, gde ulazi u građu intraćelijskih enzima (2). Ljudski organizam skladišti gvožđe u obliku proteinskih kompleksa, hemosiderina i feritina, u jetri, slezini, duodenumu, koštanoj srži i u manjoj količini u drugim organima (3). Istraživanja su pokazala da su jetra i slezina mesta gde se gvožđe u najvećoj meri akumulira prilikom njegove ekscesivne aplikacije (4,5). Gvožđe vezano za plazmatski transferin predstavlja 0,1 % celokupnog gvožđa u organizmu, ali je u kinetičkom smislu najaktivniji pul (6). Sistemska gvožđe je regulisano na nivou apsorpcije jer nije regulisana njegova ekskrecija, pa u potpunosti zavisi od deskvamacije epitela, fiziološkog ili patološkog krvarenja. Apsorpcija je najvećim delom regulisana hormonima, u zavisnosti od potreba organizma. Najbitniji hormon za regulaciju apsorpcije je hormon jetre, hepcidin, koji regulaciju vrši preko membranskog proteina, feroportina, eksprimiranog na mnogim ćelijama u organizmu (eritrociti, makrofazi, ćelije jetre i placentе) (7). Iako je njegovo prisustvo nezamenljivo za ljudski organizam, koncentracija gvožđa u tkivima mora da bude strogo regulisana (8).

Starenje je definisano kao univerzalan i neizbežan fiziološki proces koji je rezultat niza štetnih promena akumuliranih u ćelijama i tkivima, koje su odgovorne za povećan rizik od morbiditeta i mortaliteta. Oštećenja najčešće nastaju kao posledica stalnog izlaganja ultraljubičastom (UV) zračenju, raznim mehaničkim oštećenjima ili oksidativnom stresu (9). Sa starenjem, pored disfunkcije mnogih organa i organskih sistema, dolazi i do disbalansa u sveukupnoj količini vode, elektrolita (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) i oligoelemenata (Fe, Mn, F, Co, Ni, Zn, I). U poslednjih par decenija dokazano je da se kod starijih osoba poremećaji homeostaze gvožđa javljaju često u poređenju sa ostalim oligoelementima. Poremećaj homeostaze gvožđa se najčešće manifestuje kao deficit gvožđa u celokupnom organizmu (10). Poznato je da je nedostatak gvožđa uzrok jedne od najučestalijih bolesti starije populacije, sideropenijske anemije, a javlja se usled čestih hroničnih inflamacija, okultnih gastrointestinalnih krvarenja, upotrebe nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) i peptičkog ulkusa (11). Određene studije su, međutim, pokazale da se nivoi gvožđa u određenim tkivima povećavaju sa starenjem. Značajan porast je otkriven u moždanom tkivu zdravih individua, a naročito visoke vrednosti se otkrivaju kod degenerativnih oboljenja moždanog tkiva (Alchajmerova demencija), ali nije utvrđena uzročno-posledična veza (12-13). Dokazano je da nagomilavanje gvožđa dovodi do povećanog oksidativnog stresa i oštećenja ćelija i tkiva, dok manjak može da dovede do sideropenijske anemije i drugih štetnih efekata (14).

Iz svega navedenog vidimo da su promene u koncentraciji gvožđa kod starih uočljive i česte. Upravo zbog

učestalosti poremećaja homeostaze gvožđa u populaciji starih, kao i zbog nekonzistentnosti podataka u literaturi o ovoj pojavi, našu pilot studiju smo zasnovali na ispitivanju ovog oligoelementa. Cilj našeg oglеda je bio da ispitamo sadržaj gvožđa u pojedinim organima oglednih životinja, kao i moguću kauzalnu vezu između ove dve pojave, koristeći eksperimentalni model starosti.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćene jedinke pacova muškog pola Vistar soja, dobijene iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Jedinke su dobijene kada su imale 8 nedelja i gajene su do dostizanja željene starosti. Podeljene su u dve grupe i smeštane u zasebne kaveze koji su sadržali po 4-5 jedinki. Hrana i voda su im slobodno (*ad libitum*) bile na raspolaganju. U trenutku žrtvovanja, prva grupa (grupa mladih) bila je stara deset nedelja, a druga grupa (grupa starih) bila je stara tri godine. Pri eksperimentalnom radu poštovan je Etički kodeks naučnoistraživačkog rada Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a sprovođenje ogleda odobrio je Etički komitet za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi eksperimentalni protokoli su sprovedeni u saglasnosti sa procedurama opisanim u Zdravstvenom vodiču za brigu i korišćenje eksperimentalnih životinja (engl. *Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, Washington DC, USA). Svi protokoli koji se tiču eksperimentalnih životinja razmotreni su i odobreni od strane Etičkog komiteta.

Dizajn eksperimenta

Dvadeset životinja je podeljeno u dve grupe: stare i mlade. I prva i druga grupa su sadržale po deset jedinki. Nakon dostizanja željene starosti sve jedinke su žrtvovane u opštoj etarskoj anesteziji, a njihova tkiva su dalje tretirana u cilju određivanja sadržaja gvožđa u njima.

Određivanje gvožđa u tkivima

Gvožđe je određivano u krvi, bubregu, testisu, jetri i srcu.

Ukupno serumsko gvožđe određeno je korišćenjem Biosistenskog fotomera tipa BTS-330 prema uputstvima proizvođača. Jon gvožđa je u svom ferioobliku (Fe^{+3}) vezan za transferin. Upotrebom gvanidijuma gvožđe je odvojeno od ovog plazmatskog proteina, a zatim pomoću hidroksilamina redukovano u ferooblik (Fe^{+2}). Posle toga je dodat ferozin sa kojim su ferojoni (Fe^{+2}) formirali obojene komplekse koji su mereni spektrofotometrijski.

Uzorci tkiva iz srca, bubrega, testisa i jetre su prepremljeni mikrotalasnom digestijom (*ETHOS TC, Milestone S.r.l., Sorisole, Italy*) prema uputstvima proizvođača. Ciljno tkivo (0,5 g) tretirano je sa 8 ml azotne kiseline (HNO_3) i 2 ml hidrogen-peroksida (30% H_2O_2). Temperaturni režim je sledeći: tkivo je 5 minuta bilo na sobnoj temperaturi, a zatim je preneto na 180°C i na ovoj temperaturi je stajalo 10 minuta. Uzorci su nakon hlađenja pomoću dejonizovane vode prebačeni u normalan sud od 50 ml. Analize su vršene na atomskom apsorpcionom spektrometru „SpectrAA 220“. Analitički kvalitet kontrole je postignut analiziranjem potvrđenog referentnog materijala BCR-186 (*Community Bureau of Reference - BCR, Brussels, Belgium*). Ovaj materijal predstavlja liofilizovani bubreg svinje korišćen za određivanje elemenata u tragu (*Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium*). Vrednosti gvožđa su izražene kao $\mu\text{g Fe}$ po mg osušenog analiziranog tkiva.

Statistička analiza

Statističke analize su korišćenjem softvera SPSS za Windows, verzija 18.0. Za poređenje dve grupe korišćen je Man-Vitni (*Mann-Whitney*) U test.

Rezultati

U ovom istraživanju smo ustanovili da u tkivima eksperimentalnih životinja iz grupe starih jedinki postoji statistički značajna promena koncentracije gvožđa ($p < 0,001$ i $p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu mladih. Dobijeni rezultati merenog gvožđa u ove dve grupe jedinki prikazani su na **grafikonu 1**.

Grafikon 1. Prikaz količine gvožđa ($\mu\text{g Fe/g}$ tkiva) u različitim tkivima kod dve grupe eksperimentalnih životinja (* - p vrednost $< 0,01$; ** - p vrednost $< 0,001$).

Merenjem u bubregu pokazan je statistički veoma značajan porast gvožđa u grupi starih jedinki ($106,17 \pm 34,26 \mu\text{g Fe/g}$) u odnosu na grupu mladih ($77,43 \pm 10,25 \mu\text{g Fe/g}$; $p < 0,001$).

Merenjem u testisu je pokazano statistički veoma značajno nakupljanje gvožđa u grupi starih ($75,84 \pm 22,97 \mu\text{g Fe/g}$) u odnosu na mlade ($24,19 \pm 1,66 \mu\text{g Fe/g}$; $p < 0,001$).

Merenje u krvi je pokazalo da i ovde dolazi do statistički značajnog nakupljanja u populaciji starih ($509,64 \pm 31,09 \text{ mg Fe/dl}$) u odnosu na mlade ($478,12 \pm 27,94 \text{ mg Fe/dl}$; $p < 0,01$).

Eksperimentom smo još pokazali da postoji tendencija opadanja koncentracije gvožđa u jetri i u srcu kod starih jedinki, ali se ovi rezultati nisu pokazali statistički značajni.

Diskusija

Koliki je značaj gvožđa govori i podatak o visokoj stopi morbiditeta i mortaliteta koja se javlja kod osoba koje imaju deficit ovog elementa, dok se njegov suficit smatra toksičnim za ćelije i tkiva (8, 12). Podaci iz literature o distribuciji gvožđa u pojedinim organima u toku starenja su oskudni i nekonzistentni. Uticaj disbalansa gvožđa na normalno funkcionisanje organa, kao i mogućnost povezanosti ovog disbalansa sa starenjem podstiče nova istraživanja u ovom pravcu.

U centru istraživanja poslednjih godina bila je povezanost između akumulacije gvožđa u tkivu mozga, kao i utvrđivanje uzročno-posledične veze između koncentracije gvožđa i starenja kod neurodegenerativnih procesa (13-19). Ova činjenica nas je navela da istraživanje preusmerimo na druga tkiva u organizmu i ispitamo kakve se promene u količini gvožđa dešavaju u njima prilikom starenja organizma. Uzimajući u obzir oskudnost podataka o distribuciji gvožđa u pojedinim tkivima, u našem ogledu je analiziran sadržaj gvožđa u krvi, bubregu, jetri, slezini, testisu i srcu na eksperimentalnom modelu starenja.

Starenje je ireverzibilan, progresivan fiziološki proces koji, pored ostalih štetnih promena u organizmu, dovodi do promene u koncentraciji oligoelemenata, u prvom redu gvožđa, što je pokazano visokom prevalencijom starijih osoba sa sideropenijskom anemijom. Prema nekim studijama, preko 15% osoba starijih od 65 godina pati od anemija, koje su u najvišem procentu posledica nedostatka gvožđa (20).

Nasuprot tome, istraživanja usmerena na urođena (primarna hemohromatoza) i stečena stanja (stečena hemohromatoza kod oštećenja koštane srži) koja dovode do nagomilavanja ukupnog gvožđa u organizmu dokazala su da kod jednog dela bolesnika dolazi do povećanog rizi-

ka od intolerancije na glukozu, dijabetesa melitusa, oštećenja endokrinih organa, srčane disfunkcije, fibroznih promena u jetri, pa čak i do smrti uzrokovane najčešće srčanom disfunkcijom (12, 21). Potvrđeno je i da disregulacija gvožđa, koja dovodi do njegovog viška intracelularno, rezultira njegovim prooksidativnim dejstvom sa posledničnim oštećenjem i starenjem ćelije (22).

Naši rezultati pokazuju da u grupi starih jedinki dolazi do značajnog porasta količine gvožđa u tkivu bubrega. Dosadašnja istraživanja su pokazala da nagomilavanje gvožđa u bubrezima eksperimentalnih životinja dovodi do povećanja oksidativnog stresa, kao i do smanjenja antioksidativnog kapaciteta. Pokazano je, takođe, da ove promene utiču na lošiju prognozu nekih bolesti, kao i da su potencijalni kofaktor u nastanku dijabetesne nefropatije (23). Pretpostavljamo da je ovakav nalaz dobijen zbog toga što u starosti funkcija bubrega znatno slabi, tj. dolazi do smanjenja glomerulske filtracije i sekrecije, što potencijalno može da uzrokuje taloženje gvožđa u ovom tkivu. U bubregu se sa godinama dešavaju i značajne morfološke promene koje dodatno slabe njegovu funkciju (24).

Rezultati pokazuju značajno povećanje koncentracije gvožđa u serumu starih jedinki. Ovaj podatak nije u skladu sa većim brojem dosadašnjih istraživanja koja pokazuju tendenciju ka padu nivoa gvožđa u populaciji starih ljudi (preko 65 godina) (25, 26). Moguće je da su ovakvi rezultati dobijeni zbog čestih komorbiditeta kod starih ljudi (akutne i hronične infekcije, maligniteti, razne kombinovane terapije koji mogu da povise nivo hepcidina i da utiču na akutno smanjenje gvožđa u serumu) (26). Ovakva kontradiktornost rezultata može da bude i posledica različitog dizajna studije jer je u našem eksperimentu korišćen animalni model, dok su u ostalim studijama nivoi gvožđa u serumu mereni uglavnom u humanoj populaciji. Osim toga, moguće je da je relativni rast gvožđa u serumu posledica smanjenja cirkulišuće tečnosti, što je isto tako poremećaj koji prati starenje.

U našem ogledu smo uočili značajno povećanje koncentracije gvožđa u tkivu testisa kod starih jedinki. Pretpostavljamo da su uzrok povećanja gvožđa upravo strukturne promene tkiva testisa u starosti (atrofija) i njegova disfunkcionalnost, što potencijalno može da bude razlog zašto organizam teži da taloži ekscesivne količine gvožđa u tkiva koja mu u tom trenutku nisu od vitalnog značaja. U starenju dolazi i do oštećenja krvno-testikularne barijere, što bi takođe moglo da objasni taloženje gvožđa u ovom tkivu. U prethodnim istraživanjima je pokazano da izlaganje eksperimentalnih životinja velikim količinama gvožđa dovodi do njegovog nakupljanja u testisu (27). Ovakve promene posledično dovode do promena u vidu degeneracije seminifernih tubula, atrofije tkiva i poremećaja ili potpunog odsustva spermatogeneze (27).

Zaključak

U ovom eksperimentu smo dokazali da starost uzrokuje statistički značajno nagomilavanje gvožđa u tkivu testisa, bubrega i krvi, dok količina gvožđa u jetri i srcu pokazuje tendenciju opadanja. Ovakav disbalans gvožđa potencijalno može da dovede do oštećenja ovih tkiva i da uzrokuje poremećaje koji prate starenje.

Literatura

1. Hurrell RF. Bioavailability of iron. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51: 4–8.
2. Saito H. Metabolism of iron stores. *Nagoya Journal of Medical Sciences.* 2014; 76(3-4): 235-254
3. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202: 199–211
4. Dickinson TK, Devenyi AG, Connor JR. Distribution of injected iron 59 and manganese 54 in hypotransferrinemic mice. *J Lab Clin Med* 128: 270-278
5. Papanastasiou DA, Vayenas D, Vassilopoulos A, Repanti M. Concentration of Iron and Distribution of Iron and Transferrin After Experimental Iron Overload in Rat Tissues in vivo. *Pathology - Research and Practice.* 2000;196: 47-57
6. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World Gastroenterol* 2009;15: 4617–4626
7. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hpcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306: 2090-2093
8. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem.* 2002;91: 9–18
9. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5: 557–61
10. E. Çoban, M. Akın, A. Aykut, A. Timuragaoglu. The frequency and morphological distribution of anemia in elderly patients. *Turkish Journal of Geriatrics.* 2003; 7:131–132
11. Rockey DC, Cello JP. Evaluation of the gastro-intestinal tract in patients with iron- deficiency anemia. *Ne Eng J Med.* 1993;329: 1691-5
12. Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron chelating therapy. *Acta Haematol.* 1996;95: 26–36.
13. Bartzokis G, Mintz J, Sultzer D, et al. In vivo MR evaluation of age-related increases in brain iron. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1994;15: 1129–1138
14. Pankhurst Q, Hautot D, Khan N, Dobson J. Increased levels of magnetic iron compounds in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2008;13: 49–52.
15. Smith MA, Zhu X, Tabaton M, et al. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis.* 2010;19: 363–372
16. Bartzokis G, Lu PH, Tingus K, et al. Gender and iron genes may modify associations between brain iron and memory in healthy aging. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36: 1375–1384

17. Singh N, Swati H, Ajai KT, et al. Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms To Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20: 1324-1363
18. Kell DB. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Archives of Toxicology*. 2010;84: 825-889
19. Ayton S, Lei P. Nigral Iron Elevation Is an Invariable Feature of Parkinson's Disease and Is a Sufficient Cause of Neurodegeneration. *BioMed Research International*. 2014;2014:581
20. Blanc B., Finch C. A., Hallberg L., et al. Nutritional anaemias report of a WHO scientific group. World Health Organ. Tech. Rep 1998. Ser. 4051-40
21. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron Deficiency and Overload. *Hematology*. 2003;40-61
22. Mallikarjun V, Sriram A, Scialo F, Sanz A. The interplay between mitochondrial protein and iron homeostasis and its possible role in ageing. *Experimental Gerontology* (2014); 56: 123-134
23. Wanxia G, Xueli L, Zhonghong G, Hailing L. Iron Increases Diabetes - Induced Kidney Injury and Oxidative Stress in Rats. *Biological Trace Element Research*. 2014;160: 368-375
24. Luran MM. Renal function in elderly. *Ann Clin Lab Sci*. 1995;25: 122-133
25. Joosten E, Pelemans W, Hiele M. Prevalence and causes of anemia in a geriatric hospitalised population. *Gerontology* 1992; 28:111-7
26. Busti F, Campostrini N, Martinelli N, Girelli D. Iron deficiency in the elderly population, revisited in the hepcidin era. *Front Pharmacol*. 2014; 5:83
27. L. Golberg, J P Smith, Martin LE. The effects of intensive and prolonged administration of iron parenterally in animals. From Bengel Laboratories Ltd., Holmes Chapel, Cheshire, and the Department of Pathology. University of Manchester