

Skutki nadmiernej podaży żelaza królikom w aspekcie zmian ilościowych glikozoaminoglikanów w ich wątrobach

ROMAN ALEKSIEWICZ, IZABELA MACIEJEWSKA-PASZEK*, MARIUSZ SKIBA**, MARIA WARDAS*, MAŁGORZATA STEC*

Lecznica dla zwierząt, Siemianowice Śląskie

*Katedra i Zakład Żywności i Żywienia Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu

**Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Nr 4 w Bytomiu

Aleksiewicz R., Maciejewska-Paszek I., Skiba M., Wardas M., Stec M.

The effects of excessive supply of iron to rabbits with respect to the content of glycosaminoglycans in their livers

Summary

The aim of the experiment was an attempt at answering the question if an excessive supply of iron has an influence on the content of GAG in the liver. The experiment was carried out using Chinchilla rabbits (3,2±0.1 kg b.w.). The animals were divided into 3 groups (7 rabbits in each group) and one control group (5 rabbits). The animals in each group except the control group received a pharmaceutical form of iron (intramuscular injection of Jectofer 15 mg/kg b.w./day) for 10, 90 and 120 days, the control group received 0.9% NaCl in an identical manner. Respectively after 10, 90 and 120 days the animals were put to sleep (pentobarbital sodium), and after that GAG were isolated from their livers. Glycosaminoglycans were isolated using Svejcer method as modified by Wosicki. The GAG quantity was determined by Bitter and Muiry method by means of glucuronic acid contained in it. After 10 days of Jectofer administration we noticed a 15% decrease of GAG quantity in rabbits' livers in contrast with the control group; on the other hand after 90 and 120 days of the experiment we noticed increased GAG quantity in the investigated livers by 33% and 62% respectively compared with controls. The obtained results permit us to ascertain that an excessive supply of iron in rats leads to restructuring in the connective tissue of the liver, the noticed changes of GAG quantity were the proof of this. One of the consequences may be the hepatic injury. Although our experiment cannot give a sufficient answer as to how and why excessive accumulation of iron causes the increase of GAG quantity in rabbits' livers after a long lasting exposition on high doses of Jectofer, with great probability we can say that all those changes are the result of the disturbance of oxidative homeostasis in the liver.

Keywords: glycosaminoglycans, iron, liver.

Naruszenie struktury morfologicznej lub biochemicznej narządu skutkuje postępującą jego niewydolnością. Dotyczy to również wątroby oraz jej tkanki łącznej i choć tkanka łączna stanowi niewielką część całego narządu jest istotna dla jego właściwego funkcjonowania (3, 16, 27). Tkanka łączna tworzy wysoce zintegrowany system strukturalno-czynnościowy biorący dynamiczny udział w funkcjach życiowych zwierzęcia, zależny od czynników fizjologicznych i patologicznych (1, 9, 23). Zaburzenie homeostazy tkanki łącznej skutkuje zmianą właściwości immunogennych, antygenowych i chemoaktywnych budujących ją składników (16). Tkanka łączna bierze czynny udział w procesach regenerujących mięszu wątroby (19, 22, 27). Potwierdzeniem tego jest analiza zawartości glikozoaminoglikanów (GAG), głównego składnika substancji podstawowej tkanki łącznej, przeprowadzona w poszczególnych okresach mitozy hepatocytów po 55% hepatektomii u psa (24).

Glikozoaminoglikany cechuje znaczne zróżnicowanie mas cząsteczkowych oraz polianionowość związana z obecnością w ich cząsteczkach grup karboksy-

lowych i siarczanowych (9, 11, 13, 15, 22). Proteoglikany, w skład których wchodzi GAG przejmują od nich charakterystyczną polianionowość co determinuje między innymi procesy adhezji i migracji komórek (12, 14, 28). Na metabolizm GAG istotny wpływ wywierają zarówno czynniki endogenne jak i egzogenne w tym jony metali.

Zarówno niedobór jak i nadmiar żelaza jest określonym zagrożeniem dla organizmu (25). Nadmierne gromadzenie jonów żelaza w postaci złóż hemosyde-ryny prowadzi do hemochromatozy, a w konsekwencji do uszkodzenia wątroby (6-8, 18, 20). Obraz kliniczny hemochromatozy obejmuje marskość wątroby, zwłóknienie trzustki, cukrzycę typu II. Wydaje się, że istnieją predyspozycje gatunkowe wśród ptaków; chorobą notowana jest głównie wśród tukanów, ponadto ulegają jej szpaki Rothschilda, sowy, papugi i pingwiny (5).

Jedną z teorii tłumaczących toksyczność jonów żelaza jest jego udział w generowaniu reaktywnych form tlenu czyli tzw. wolnych rodników (10, 17). Żelazo wywiera również istotny wpływ na zapotrzebowanie i

wchłanianie jonów innych metali np. miedzi, cynku i wapnia (4, 15).

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie czy wzmożona podaż żelaza ma wpływ na zawartość glikoaminoglikanów w wątrobie co może w konsekwencji doprowadzić do upośledzenia jej funkcji.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na królikach płci męskiej rasy szynszyl o masie ciała $3,2 \pm 0,1$ kg. Zwierzęta pochodziły z Centralnej Zwierzętarńi Śląskiej Akademii Medycznej i przez cały czas eksperymentu pozostawały na pełnowartościowej diecie oraz były pojone wodą *ad libitum*. Króliki były utrzymywane w klatkach pojedynczo, w temperaturze pokojowej, przy naturalnym oświetleniu. Przez cały czas doświadczenia miały zabezpieczoną opiekę weterynaryjną, a ich stan zdrowia był monitorowany poprzez prowadzone stałe oględziny oraz badania morfologiczne krwi.

Króliki podzielono losowo na 4 grupy, z czego 3 (tzw. doświadczalne) liczyły po 7 królików, a grupa kontrolna 5 królików.

Zwierzętom grup doświadczalnych podawano przez 10, 90 i 120 dni w formie iniekcji domięśniowych farmakologiczny preparat żelaza Jectofer (Astra, D. Bosnalijek, YU) w ilości 15 mg/kg m.c./dobę. Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały w formie iniekcji domięśniowych roztwór soli fizjologicznej.

Odpowiednio po 10, 90 i 120 dniach zwierzęta usypiano pentobarbitem sodu (30 mg/kg m.c.). Po uśpieniu królika i przygotowaniu pola operacyjnego wykonywano cięcie powłok brzusznych w kresie białej i pobierano wątrobę do dalszych badań. Po uśmierceniu zwierząt wykonywano sekcję, podczas której oceniano makroskopowo i mikroskopowo pozostałe narządy.

Glikoaminoglikany wątroby izolowano wg metody Svejcera (21) w modyfikacji Wosickiego (26).

Przed przystąpieniem do izolacji glikoaminoglikanów tkankę wątrobową poddano homogenizacji w zimnym acetonie, a następnie wirowano. Odwirowany osad odłuszczało przez ekstrakcję 20 krotną objętością mieszaniny etanol:eter etylowy w stosunku objętościowym 1:1 i pozostawiano w łaźni wodnej przez dwie godziny w temperaturze 60°C . Po ponownym odwirowaniu i odrzuceniu supernatantu osad poddawano suszeniu do stałej masy. Wyszuszoną tkankę zawieszono w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,8 zawierającym 5 mM EDTA i 5 mM chlorowodoru cysteiny i poddawano trawieniu papainą w temp. $65-70^{\circ}\text{C}$ przez 6 godzin. Po tym czasie 40% roztworem kwasu trójchlorooctowego wytrącano białka, wirowano, a następnie supernatant dializowano 24 godz. wobec wody. Z dializatu wytrącano glikoaminoglikany 5% roztworem octanu potasu w etanolu. Wytrącony osad GAG odwirowywano i przeznaczono do oznaczeń ilościowych. Ilość uzyskanych GAG oznaczano metodą Bitter i Muiry (2) poprzez zawarty w nich kwas glukuronowy.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta dla zmiennych połączonych oraz testem Fischera dla sprawdzenia równości wariancji. Wyliczono także współczynnik korelacji zależności całkowitej zawartości GAG w wątrobach królików grupy kontrolnej i grup doświadczalnych od czasu podawania preparatu żelaza.

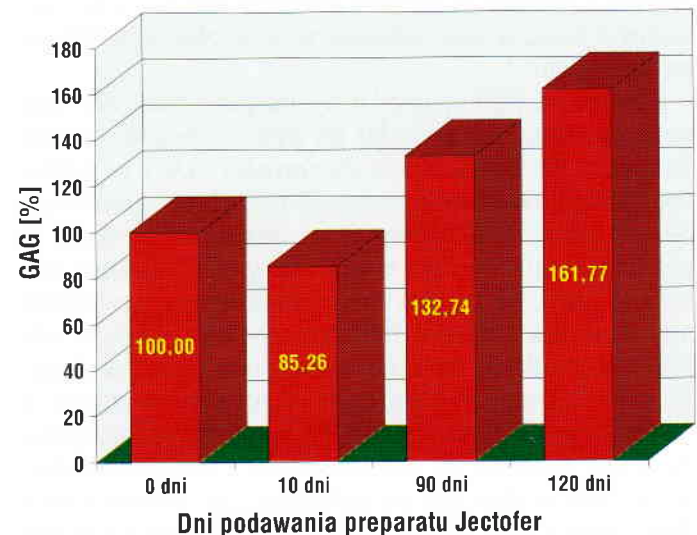
Wyniki i omówienie

Otrzymane wyniki ilościowych oznaczeń GAG w wątrobach królików podano w tab. 1. Całkowita zawartość GAG podana jako ilość μg kwasu glukuronowego w przeliczeniu na 100 mg s.m. tkanki, oznaczona w wątrobach królików grupy kontrolnej wynosiła średnio $700 \mu\text{g}$. Podawanie zwierzętom preparatu żelaza powodowało istotne zmiany ($p \leq 0,001$) w ilości GAG. I tak po 10 dniach ilość GAG w wątrobach królików zmalała do wartości średniej wynoszącej $596,99 \mu\text{g}$ kwasu glukuronowego i była około 15% niższa od średniej ilości GAG oznaczonej w wątrobach królików grupy kontrolnej (ryc. 1). Po kolejnych 80 dniach podawania królikom preparatu Jectofer, tj. po 90 dniach trwania eksperymentu, w wątrobach królików stwierdzono wzrost zawartości GAG. W porównaniu z grupą kontrolną zawartość GAG wzrosła o około 33%, zaś w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla grupy otrzymującej żelazo przez 10 dni o około 53% (ryc. 1). Jeszcze wyższą zawartość całkowitej ilości GAG stwierdzono w wątrobach królików otrzymujących preparat żelaza przez 120 dni. Była ona o 62% wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 1). Całkowita zawartość GAG w wątrobach królików grupy kontrolnej i grup doświadczalnych zależała od czasu podawania preparatu Jectofer o czym świadczy wysoki współczynnik korelacji $r = 0,93$ ($p \leq 0,05$).

Tab. 1. Całkowita zawartość GAG wyrażona w mikrogramach kwasu glukuronowego/100 mg s.m. tkanki wątroby ($x \pm s$)

Dni eksperymentu			
0	10	90	120
n = 5	n = 7	n = 7	n = 7
700,22 $\pm 7,93$	569,99* $\pm 7,10$	913,64* $\pm 6,02$	1132,76* $\pm 47,38$

Objaśnienie: *istotność w porównaniu z grupą kontrolną przy $p \leq 0,001$.



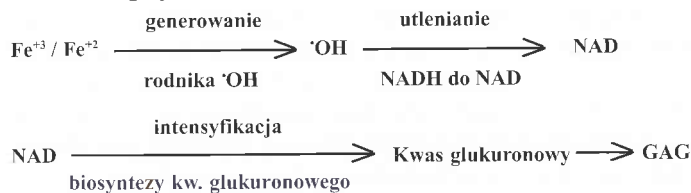
Ryc. 1. Procentowe zmiany zawartości GAG w wątrobach królików w trakcie podawania preparatu Jectofer

Przedstawione w niniejszej pracy badania przeprowadzono na młodych samcach króliczych. Wybór samców do eksperymentu pozwolił uniknąć ewentualnego wpływu hormonów rujowych na metabolizm wątroby. Fakt, że badania przeprowadzono na zwierzętach roślinożernych wydaje się pozostawać bez wpływu, tym bardziej, że badania dotyczyły pierwiastka jednakowo niezbędnego do życia zwierzętom roślinożernym jak i mięsożernym, oraz podstawowego składnika substancji międzykomórkowej tkanki łącznej – glikoaminoglikanów – pełniących identyczną rolę u zwierząt roślinożernych jak i mięsożernych.

Dawkę podawanego żelaza ustalono na podstawie danych piśmiennictwa dotyczących jego biodostępności, zaś czas trwania eksperymentu na podstawie badań pilotowych, w których stwierdzono, że okres czterech miesięcy codziennego podawania królikom preparatu żelaza powoduje już zauważalne niekorzystne zmiany. Poszczególne okresy pobierania wątrób do badań tj. po 10, 90 i 120 dniach podawania zwierzętom preparatu Jectofer ustalono również po badaniach pilotowych i wydaje się, że znalazły one potwierdzenie w ocenie glikoaminoglikanów izolowanych z wątrób. Czteromiesięczny okres życia w przypadku królików nie jest jeszcze na tyle długi, by pojawiającym się zmianom starczym organizmu przypisywać obserwowany wzrost zawartości GAG w wątróbach. Jest to niezwykle istotne ponieważ wiadomo, że ilość glikoaminoglikanów tkanki łącznej, nie tylko wątroby, zmienia się wraz z wiekiem. Przyjmuje się jednak, że fizjologiczne zmiany w procesie starzenia dotyczące glikoaminoglikanów przypadają na drugą połowę długości życia organizmu, zaś króliki siedmiomiesięczne są jeszcze zwierzętami młodymi. Należy zatem sądzić, że stwierdzone w pracy zmiany ilościowe glikoaminoglikanów wątrób królików, którym podawano preparat żelaza są odpowiedzią organizmu na wzmożoną podaż żelaza. Zmiany te dotyczą prawie dwukrotnego (pod koniec eksperymentu) wzrostu całkowitej zawartości glikoaminoglikanów w wątróbach królików eksponowanych na żelazo, w porównaniu z ilością stwierdzoną w wątróbach królików kontrolnych.

Mimo, że przeprowadzony eksperyment nie daje bezpośredniej odpowiedzi na pytanie w jaki sposób dochodzi do zwiększenia zawartości GAG w wątróbach królików eksponowanych na żelazo, niemniej z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że jest to efekt naruszenia homeostazy oksydacyjnej wątroby i jest on konsekwencją bezpośredniego uczestnictwa jonów żelaza w reakcjach wolnorodnikowych. Idąc takim tokiem rozumowania można przypuszczać, że w obecności zwiększonej ilości jonów żelaza w organizmie dochodzi raczej do wzmożonej biosyntezy GAG, a nie do jej zahamowania. Przesłanką takiego rozumowania jest świadomość, że intensywność biosyntezy GAG, a konkretnie niezbędnego ich składnika, a mianowicie kwasu glukuronowego, zależy wprost od dostępności utlenionej formy dinukleoty-

dunikotynoamidoadeninowego (NAD). Reaktywne formy tlenu, szczególnie rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), powstający w komórce między innymi w reakcji Habera-Weisa stymulowanej przez jony żelaza, jest zdolny do utlenienia NADH do NAD na co wskazują wartości potencjałów normalnych reakcji: NAD/NADH ($E = 0,32 \text{ V}$) i reakcji $\cdot\text{OH}, \text{H}^+ / \text{H}_2\text{O}$ ($E = 2,31 \text{ V}$), a tym samym do zapewnienia komórce wysokiego stężenia NAD. Tak więc domniemany mechanizm wzrostu całkowitej zawartości GAG w wątróbach królików, którym podawano preparat żelaza można by przedstawić następująco:



Prawdopodobnie uruchomienie takiego mechanizmu wymaga pewnego okresu adaptacyjnego organizmu. W przypadku przeprowadzonego eksperymentu jest to okres około 10 dni podawania królikom preparatu żelaza, kiedy obserwowano nieznaczny (zaledwie 15%) spadek ilości GAG w wątróbach.

Uzyskane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że wzmożona podaż żelaza doprowadza u królików do przebudowy tkanki łącznej wątroby, dowodem czego są zaobserwowane w pracy zmiany ilościowe GAG, a konsekwencją tego może być uszkodzenie wątroby.

Piśmiennictwo

- Barkalov D. F. J., Schwarzbauer J. E.: J. Biol. Chem. 269, 3957, 1994.
- Bitter T., Muirry M. A.: Annal. Biochem. 4, 330, 1962.
- Comper W. D., Laurent T. C.: Physiological function of connective tissue polysaccharides. Physiol. Rev. 58, 225, 1978.
- Cardoso L. E., Mauro P. A.: Braz. J. Med. Biol. Res. 27, 509, 1994.
- Cornelissen H., Ritchie B. V., Ramphaside: Wingers Publishing. 1276-83, 1994.
- Egawa H., Berquist W., Garcia Kennedy R., Cox Kinsley A. S., Esquivel C. O.: Transplantation. 62, 1511, 1996.
- Fagion S., Fracanzani A. L., Romano R., Cappellini M. D., Fare M., Mattioli M., Piperno A., Ronchi G., Fiorelli G.: J. Hepatol. 24, 564, 1996.
- Fleet J. C.: Nutr. Rev. 54, 285, 1996.
- Głowacki A., Koźma E., Olezyk K.: Pos. Bioch. 41, 139, 1995.
- Goldenberg H., Scheiber B.: Wien. Klin. Wochenschr. 107, 669, 1995.
- Jackson R. L., Bush S. J., Cardin A. D.: Physiol. Rev. 71, 481, 1991.
- Kjellén L., Lindhal U.: Ann. Rev. Biochem. 60, 443, 1991.
- Kula B., Jurczak T., Przeniosło L., Pawłowska-Góral K., Szade A., Wardas M.: Ann. Acad. Med. Siles. 29, 273, 1995.
- Mueller M. P., Ther L. A.: J. Appl. Physiol. 63, 1033, 1987.
- Pallares I., Campos M. S., Lopez-Aliaga I., Barriomuevo M., Gomez-Ayala A. E., Alferes M. J. M., Hartiri S., Lisbona F.: Ann. Nutr. Metab. 40, 81, 1996.
- Pruillet C., Lortat-Jacob H., Boltzot F.: Cel. Mol. Biol. 42, 169, 1996.
- Qiean Z. M., Tang T. L., Morgana E. H.: Biochem. Biophys. Acta. 1310, 293, 1996.
- Roels S., Ducatelle R., Cornelissen H.: Analytical and Quantitative Cytology and Histology. 18, 221, 1996.
- Santosh A., Mathews S., Sudhakaran P.: Mol. Cell. Biochem. 6, 165, 1, 1996.
- Simpson R. J., Konijon A. M., Lombard M., Raja K. B., Salisbury J. R., Peters T. J.: J. Pathol. 171, 237, 1993.
- Svejar J., Van Robertson W. B.: Annal. Biochem. 18, 333, 1967.
- Toyoki Y., Yoshihara S., Sasaki M., Konn M.: J. Hepatol. 26, 1135, 1997.
- Tomaszewski J., Donica W.: Struktura i funkcje proteoglikanów. Post. Biochemii. 34, 209, 1988.
- Toyoki Y., Yoshihara S., Sasaki M., Konn M.: J. Hepatol. 26, 1135, 1997.
- Weeks B. R., Smith J. E., Northrop J. K.: Am. J. Vet. Res. 50, 198, 1989.
- Wosicki A.: Gin. Pol. 45, 1055, 1974.
- Vrochides D., Papanikolaou V., Pertoft H., Antoniadis A. A., Heldin: Hepatol. 23, 1650, 1996.
- Żak I.: Post. Biol. Kom. 22, 317, 1995.

Adres autora: dr Roman Aleksiewicz, ul. Wróbla 10a, 41-100 Siemianowice Śląskie