



ایجاد مدل مسمومیت کبدی ناشی از اضافه بار آهن و بررسی تاثیر آن روی سطوح سرمی هپسیدین در موش صحرایی نر نژاد اسپراگو

ودود ملک زاده^۱، فریده منافی^۲، آرش مهری پیرایواتلو^۳، علی نعمتی^۴، رضا علی پناه مقدم^{۵*}

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۲ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۳ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۴ دانشیار تغذیه، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۵ استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول: رضا علی پناه مقدم، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران، ایمیل: alipanahreza9@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjmd-010029

چکیده

مقدمه: مسمومیت با آهن در اثر تجمع آهن در بافت های مختلف بدن و به ویژه کبد، قلب و غدد درون ریز ایجاد می شود. این اختلال باعث ایجاد عوارض مهمی مانند کاهش رشد، دیابت، سیروز کبدی و نارسایی قلبی می شود. ما در این تحقیق سعی نموده ایم تا با ایجاد مدل اضافه باری آهن زمینه را برای شناسایی راه های مقابله با این اختلال فراهم نماییم. **روش کار:** در این مطالعه از ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو بالغ با وزن ۲۸۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. موش ها به دو گروه ۶ تایی شامل کنترل و مداخله تقسیم شدند. برای ایجاد اضافه باری آهن از تزریق داخل صفاقی آهن دکستران استفاده شد. برای بررسی رسوب آهن از رنگ آمیزی هماتوکسین - اتوزین استفاده گردید. سطوح سرمی هپسیدین به روش الیزا اندازه گیری شد. سطوح سرمی آهن با روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. **یافته ها:** نتایج نشان دهنده ی تجمع قابل توجه آهن در نمونه های بافت کبدی موش های گروه مداخله با آهن دکستران در مقایسه با گروه کنترل می باشد. سطوح سرمی هپسیدین (0.12 ± 0.02 در مقابل 0.12 ± 0.01 پیکوگرم در دسی لیتر) و سطوح سرمی آهن ($258 \pm 6/18$ در مقابل $186 \pm 3/34$ میلی گرم در دسی لیتر) در گروه مداخله بیشتر از گروه کنترل بوده و هر دو گروه رابطه معنی داری با اضافه باری کبدی آهن داشتند ($P < 0.05$). **نتیجه گیری:** تزریق داخل صفاقی آهن دکستران به میزان ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم می تواند باعث ایجاد اضافه باری آهن و افزایش سطوح سرمی هپسیدین در موش های اسپراگو شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۸

واژگان کلیدی:

اضافه باری آهن

موش صحرایی اسپراگو

هپسیدین

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

مقدمه

ریش سلول های جدار روده کوچک (تنها مسیر دفع آهن) از بدن دفع می شود [۲، ۴]. به دلیل نبود یک مکانسیم فیزیولوژیک اختصاصی برای دفع آهن، در صورتی که آهن به مقدار زیادی از طریق رژیم غذایی وارد بدن شود، مسیرهای متابولیکی آهن دچار اختلال شده باشند و یا در صورتی که فرد در اثر ابتلا به بیماری هایی نظیر تالاسمی نیاز به تزریق های مکرر خون داشته باشد، آهن اضافی در بدن انباشته شده و باعث ایجاد مسمومیت با آهن و اضافه باری آن می شود [۴، ۵]. انواع اضافه باری آهن به دو گروه اصلی اولیه (ارثی) و ثانویه تقسیم می شوند. اضافه باری آهن اولیه (ارثی) در اثر جهش در ژن هایی مانند پروتئین هموکروماتوزیس انسانی (HFE)، رسپتور ترانسفرین، ژن کد کننده هپسیدین و یا جهش در ژن کد کننده پروتئین هموجوولین ایجاد می شود [۶]. اشکال اضافه باری ثانویه آهن شامل انواع القا شده با آنمی همولیتیک مزمن، مسمومیت آهن ناشی از

آهن به عنوان یک عنصر ضروری برای تولید انرژی، حمل اکسیژن، تکثیر سلول ها و انجام اکثر فعالیت های زیستی در موجودات زنده محسوب می شود [۱]. این عنصر در رژیم غذایی به دو صورت همی و غیر همی وجود دارد و عمدتاً توسط سلول های قسمت دئودنوم روده کوچک از دو مسیر جذبی همی (توسط انتقال دهنده هم) و غیر همی توسط انتقال دهنده آهن دو ظرفیتی یا (DMT1) جذب می شود [۲، ۳]. در بدن یک فرد سالم بیش از دو سوم آهن بدن در ساختار گلوبول های قرمز و پیش سازهای آنها به کار رفته است و روزانه حدود ۲۵-۲۰ میلی گرم آهن برای تولید گلوبول های قرمز تازه مورد نیاز است [۴]. این در حالی است که مقدار قابل توجهی از آهن مورد نیاز برای خون سازی از باز یافت آهن گلوبول های قرمز پیر توسط ماکروفاژها تامین می گردد و تنها حدود ۱-۲ میلی گرم آهن روزانه از طریق روده ها جذب می شود. همواره مقادیر بسیار ناچیزی از آهن در اثر

نسبت به مطالعات یاد شده استفاده شده است. هدف ما از این پژوهش ایجاد مدل مناسبی برای بررسی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد اضافه باری آهن و نیز بررسی ترکیبات مقابله کننده با این چالش همچنین ترکیبات موثر روی کاهش بیان هپسیدین در مدل ارائه شده می‌باشد.

روش کار

این پژوهش یک نوع مطالعه تجربی بوده و با کد اخلاقی IR.ARUMS.REC.1394.125 به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل رسیده و با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است. در این آزمایش از موش‌های نر نژاد اسپراگو به عنوان حیوان مورد آزمایش استفاده شده است. موش‌های مورد نظر از بخش نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری و در محل مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل نگهداری شدند تا با شرایط محیطی تطابق کافی پیدا کنند. موش‌ها در قفس‌های پلاستیکی استاندارد مخصوص در محیطی که رطوبت و نور آن در حد استاندارد تنظیم شده بود نگهداری شدند. در شروع مطالعه موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه ۶ تایی تقسیم شدند.

گروه‌های مورد آزمایش شامل:

گروه کنترل با ۶ سر موش: دریافت کننده ۱ سی سی سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی

۲- گروه مداخله با ۶ سر موش: دریافت کننده ۱ سی سی آهن دکستران محلول در سرم فیزیولوژی با دوز 75 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان

دوز و مدت زمان انجام آزمایش براساس آزمایش پایلوت و با توجه به کارهای مشابه انتخاب شد [۱۶، ۱۷، ۲۰]. تزریق به صورت روزانه و به مدت دو هفته بصورت داخل پریتون انجام گرفت. در پایان زمان دو هفته‌ای همه موش‌ها بیهوش شدند و به دنبال خونگیری نمونه‌های بافت کبدی برای بررسی رسوب آهن جداسازی گردید. بعد از جداسازی، نمونه‌های کبدی در فرمالین ۱۰ درصد جهت فیکس شدن قرار گرفتند. پس از طی ۴۸ ساعت از فیکس شدن، نمونه‌ها در درصد‌های حجمی مختلف الکل شامل ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ درصد و الکل مطلق جهت آبیگری قرار گرفتند. در ادامه شفاف سازی نمونه‌ها در محلول گزیلول انجام شد. سپس نمونه‌ها در پارافین قالب گیری شدند. از بلوک‌های بافتی برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد. مراحل رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین به ترتیب شامل گذاشتن در محلول گزیلول به مدت ۵ دقیقه، سپس گذاشتن در ظرف حاوی الکل ۹۶٪ به مدت ۵ دقیقه، شستشو با آب، گذاشتن در محلول هماتوکسیلین به مدت ۵-۸ دقیقه، شستشو با آب، گذاشتن در محلول اسید الکل به مدت ۳۰ ثانیه، شستشو با آب، گذاشتن در محلول کربنات سدیم به مدت ۳۰ ثانیه، شستشو با آب، گذاشتن در محلول ائوزین به مدت ۵۰-۴۰ ثانیه، شستشو با آب، گذاشتن در الکل ۹۶٪ به مدت ۱-۲ دقیقه، گذاشتن در الکل ۱۰۰٪ به مدت ۱-۲ دقیقه و در نهایت شفاف سازی در محلول گزیلول به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. برای تایید رسوب آهن تصاویر میکروسکوپی لام‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای اندازه‌گیری سطوح سرمی هپسیدین از کیت شرکت cusabio (CSA-EL01010124RA) بر اساس روش الایزا استفاده شد. براساس

مکمل‌های زیرجلدی یا عضلانی آهن و یا مواردی نظیر بتا تالاسمی ماژور، آنمی سلول داسی شکل یا سندروم میلودیسیپلاستیک می‌باشد که به تزریق مکرر خون نیاز دارند [۶، ۷]. هموستاز آهن بدن نیازمند مکانیسم‌هایی است که جذب غذایی آهن، آزاد شدن آهن از ذخایر و جذب مجدد آهن مصرف شده را کنترل نمایند [۴]. ارتباط بین سلول‌هایی که آهن را مصرف می‌کنند و سلول‌هایی که آهن را برداشت می‌کنند باید به طور دقیقی تنظیم شود و در این مورد از هورمونی به نام هپسیدین به عنوان اصلی‌ترین هورمون تنظیم کننده هموستاز آهن نام برده می‌شود [۸]. این پروتئین اولین بار از اولترا فیلتره پلاسما جدا سازی شد و با مشاهده خواص آن، به عنوان پپتید ضد میکروبی بیان شده در کبد نام گذاری شد [۹]. هپسیدین یک هورمون پپتیدی کوچک می‌باشد که غنی از سیستمین بوده و عمدتاً از سلول‌های کبدی ترشح می‌شود ولی سایر بافت‌ها مانند سلول‌های بافت چربی هم می‌توانند این هورمون را سنتز می‌کنند. هپسیدین نقش حیاتی در نگهداری ثابت هموستاز آهن بدن انسان دارد [۹، ۱۰]. هپسیدین با کاهش میزان ناقل DMT1 در سلول‌های اپیتلیال روده کوچک جذب روده ای آهن را کاهش می‌دهد. هپسیدین با اتصال به فروپورتین (کانال آزاد کننده آهن از ماکروفاژها) و تخریب آن باعث کاهش آزاد شدن آهن از محل‌های ذخیره آهن (ماکروفاژها) و در نهایت کاهش میزان آهن سرم می‌شود [۱۰]. مسمومیت با آهن باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد بر می‌گردد. در شرایط نرمال و پاتولوژیک آنیون سوپراکسید (O_2^-) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تولید شده در بدن توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتاتیون پراکسیداز و کاتالاز متابولیزه شده و از بین می‌روند [۱۱]. در حالت اضافه باری آهن، یون‌های آزاد آهن با آنیون سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) طی واکنش فنتون ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\square} + OH^{\square}$) واکنش داده و رادیکال‌های سمی‌تر و واکنش پذیرتر هیدروکسیل (OH^{\bullet}) را ایجاد می‌کند [۱۱]. رادیکال‌های سمی هیدروکسیل باعث دپلمریزه کردن پلی‌ساکاریدها، شکستن رشته‌های DNA، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و شروع پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود [۱۲، ۱۳]. این رادیکال‌ها به نوبه خود باعث تخریب غشاهای سلولی و غشاهای اندامک‌های سلولی مثل میتوکندری و لیزوزوم می‌گردند. با تخریب غشای لیزوزوم، آنزیم‌های پروتئولیتیک آزاد شده و منجر به مرگ سلول می‌شود [۱۲]. با در نظر گرفتن اثرات بسیار زیانبار اضافه باری آهن به منظور یافتن راه‌های مقابله با این وضعیت سال‌های متمادی است که محققین در این زمینه مدل‌های مختلفی را ارائه کرده‌اند. برخی از محققین در این مورد از مدل تغذیه‌ای استفاده کرده‌اند از جمله دوتیگوانی و همکاران برای بررسی نقش هپسیدین در مقاومت انسولینی با دادن یک رژیم غذایی غنی از آهن به مدت ۱۶ هفته به موش صحرایی از نوع موس در آنها اضافه باری آهن ایجاد کردند [۱۴]. همچنین ماچی و همکاران به منظور بررسی تاثیر اضافه باری آهن در هیپوگنادیسم با دادن مکمل آهن به صورت غذایی به مدت ۱۱ روز در آنها اضافه باری آهن ایجاد کردند [۱۵]. برخی از محققین هم از تزریق داخل پریتون مکمل‌های آهن برای ایجاد اضافه باری آهن استفاده نموده‌اند که در این زمینه می‌توان به مدل‌های ایجاد شده توسط گائو و همکاران و نیز داس و همکاران اشاره کرد [۱۶، ۱۷]. از طرف دیگر برخی از محققین هم موش‌های ناتوان سازی شده در این زمینه استفاده کرده‌اند که می‌توان به مدل‌های ایجاد شده توسط فلورس و همکاران و نیز دورتا و همکاران اشاره نمود [۱۸، ۱۹]. در مدل ارائه شده در این پژوهش، از حداقل دوز مکمل آهن و نیز زمان کمتری برای ایجاد اضافه باری آهن

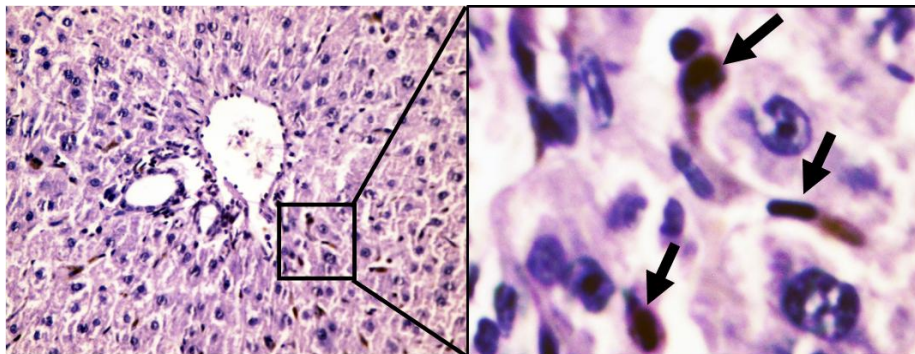
مستقل داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

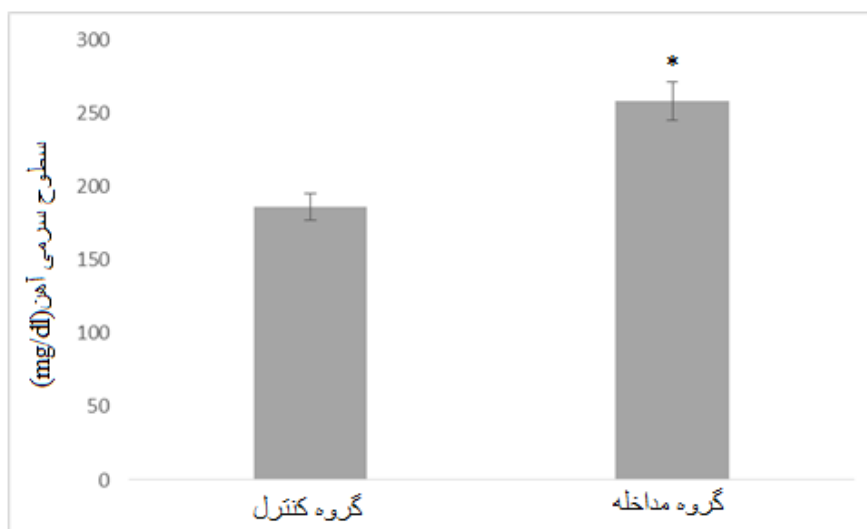
یافته‌های ما نشان دادند که تزریق دو هفته‌ای آهن دکستران باعث تجمع قابل توجه این عنصر در بافت کبد می‌شود. همانطوری که در **تصویر ۱** نشان داده شده است تجمع قابل توجهی از گرانول‌های متمایل به رنگ آبی (فلش زرد رنگ) در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی قابل رویت است. همچنین یافته‌های ما نشان دادند که تزریق آهن دکستران همزمان با ایجاد اضافه باری آهن در کبد باعث افزایش معنی‌دار در سطوح سرمی آهن در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ($P < 0.05$) (**تصویر ۲**). میانگین سطوح سرمی آهن در گروه کنترل و گروه مداخله به ترتیب $186 \pm 23/34$ و $258 \pm 6/18$ میلی‌گرم در دسی لیتر بود. همچنین نتایج ما حاکی از آن بود که سطوح سرمی هپسیدین در موش‌های تیمار شده با آهن دکستران در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (**تصویر ۳**). میانگین سطوح سرمی هپسیدین در گروه کنترل و گروه مداخله به ترتیب 0.1 ± 0.12 و 0.22 ± 0.02 پیکوگرم در دسی لیتر بود.

دستورالعمل سازنده کیت ابتدا نمونه‌ها دو برابر رقیق شدند سپس ۱۰۰ لاندا از نمونه‌ها و استانداردها در چاهک‌های مورد نظر ریخته شده و دو ساعت در دمای $37^\circ C$ نگهداری شدند سپس مایع رویی برداشته شده و آنتی بادی متصل به بیوتین اضافه شده و یک ساعت در دمای $37^\circ C$ گذاشته شدند. بعد از این مدت همه چاهک‌ها سه بار شسته شده و ۱۰۰ لاندا HRP-Avidin به کلیه چاهک‌ها اضافه گردید. در ادامه کار بعد از ۵ بار شستشو با بافر مقدار ۹۰ سی سی از سوبسترای TMB به همه چاهک‌ها اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای $37^\circ C$ گذاشته شد و بعد از طی این مدت ابتدا محلول متوقف‌کننده به همه چاهک‌ها ریخته شد و سپس جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شد. میزان آهن سرم با استفاده از کیت استاندارد (شرکت درمان کاو - ایران) با استفاده از روش رنگ سنجی در طول موج 560 نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اثبات اضافه باری آهن از اندازه‌گیری آهن سرم و مشاهده رسوب آهن در نمونه‌های بافتی استفاده گردید.

آنالیز داده‌ها بعد از جمع آوری بوسیله برنامه نرم افزاری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. ابتدا نرمال بودن توزیع نمونه‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد سپس با استفاده از روش آزمون تی

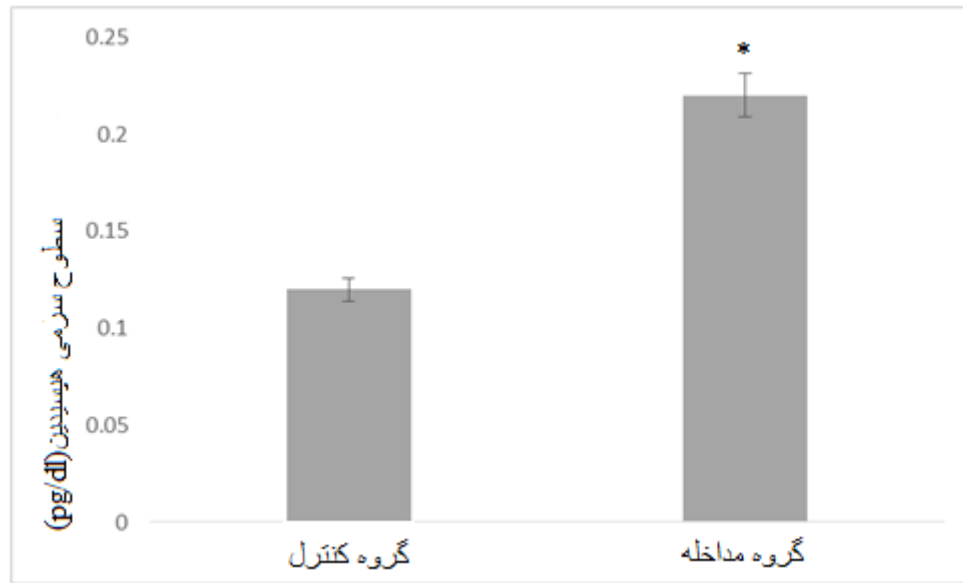


تصویر ۱: در نمونه کبد موش اسپراگو رسوب قابل توجه گرانول‌های آهن با فلش نشان داده شده است.



تصویر ۲: مقایسه سطوح سرمی آهن در دو گروه کنترل و مداخله

* تزریق آهن دکستران باعث افزایش معنی‌دار در سطوح سرمی آهن در گروه مداخله در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ($P = 0.01$). تعداد موش‌های مورد مطالعه ۱۲ سر بود.



تصویر ۳: مقایسه سطوح سرمی هپسیدین در دو گروه کنترل و مداخله

* سطوح سرمی هپسیدین در گروه مداخله در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P=0/02$). تعداد موش‌های مورد مطالعه ۱۲ سر بود.

دارد [۱۵، ۱۷، ۱۸]. در مدل ارایه شده در این پژوهش از موش صحرایی اسپراگو که جثه بزرگتری نسبت به سایر گونه‌های موش صحرایی دارد و نیز از حداقل دوز آهن دکستران و زمان کمتری نسبت به مطالعات مشابه استفاده شد که می‌تواند جزو مزایای این مدل نسبت به سایر مدل‌ها باشد.

از طرف دیگر نتایج بررسی ما نشان داد که در مدل اضافه باری آهن سطوح سرمی هپسیدین افزایش می‌یابد. همانطوریکه می‌دانیم تنظیم متابولیسم آهن توسط هورمونی به نام هپسیدین صورت می‌گیرد [۴]. ترشح کبدی این هورمون در شرایطی که بدن نیازمند آهن باشد کاهش می‌یابد تا زمینه جذب آهن بیشتری را برای بدن فراهم نماید و در شرایطی که میزان ذخایر آهن بدن افزایش داشته باشد میزان ترشح هپسیدین افزایش می‌یابد تا از جذب آهن اضافی جلوگیری نماید [۲۸]. نتایج تحقیقات متعدد حاکی از آن است که اضافه باری آهن ارتباط آشکاری با افزایش سطوح سرمی هپسیدین دارد [۸، ۲۹]. در زمینه پاتوژنز اضافه باری آهن و ارتباط آن با طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله سیروز کبدی، بیماری قلبی، دیابت و انواع مختلفی از سرطان‌ها تحقیقات متعددی انجام شده است که در زیر اشاره می‌شود [۳۰]. مارتینلی و همکاران نشان دادند که رسوب آهن در کبد می‌تواند منجر به فعال کردن سلول‌های stellate شده و با تکثیر و افتراق این سلول‌ها به سلول‌های شبیه میوفیبروبلاست زمینه را برای آسیب بافت کبد فراهم کند [۳۱]. فراکانزانی و همکاران در یک بررسی کوهورت روی ۲۳۰ نفر نشان دادند که افراد دچار اضافه باری آهن در معرض خطر ابتلا به سرطان کبد و سایر بدخیمی‌ها هستند [۳۲]. آدامس و همکاران نشان دادند که اضافه باری آهن ارتباط معنی داری با سیروز کبدی، دیابت و بیماری‌های قلبی دارد [۳۳]. براساس بررسی‌های انجام گرفته در زمینه پاتوژنز الکل و ارتباط آن با سیروز کبدی نشان داده شده است که اضافه باری آهن با تشدید اثرات الکل در ایجاد آسیب جدی کبد نقش دارد. در افرادی که دچار الکلیسم و اضافه باری آهن هستند میزان

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق داخل پری‌توان آهن دکستران به میزان ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی اسپراگو به مدت دو هفته باعث ایجاد اضافه باری آهن در کبد می‌شود. در حالیکه آهن یکی از عناصر بسیار مهم برای انجام واکنش‌های متابولیسمی و بقای اکثر موجودات زنده می‌باشد، تجمع این عنصر در داخل سلول‌ها می‌تواند اثرات مرگباری از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی داشته باشد و باعث تخریب گسترده بافت‌هایی از قبیل کبد، قلب، پانکراس و کلیه شود. از سال ۱۹۲۸ تاکنون مدل‌های حیوانی مختلفی برای ایجاد اضافه باری آهن به منظور یافتن راه‌های مقابله با آن مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند [۲۱]. در مدل‌های اولیه از حیواناتی مانند گونه ژربیل موش صحرایی، خوکچه هندی، گونه موس صحرایی و نیز گونه ویستار موش صحرایی استفاده گردید که با توجه به عدم مشابهت یا مشابهت کم اضافه باری آهن ایجاد شده در گونه‌ی ژربیل موش صحرایی و خوکچه هندی با اضافه باری مدل انسانی، محققین به استفاده از موس ویستار روی آوردند [۲۲-۲۶]. با توجه به وجود مشکلات متعددی از قبیل جثه کوچک و سخت بودن خون‌گیری و تزریق استفاده از موس زیاد متداول نمی‌باشد. همچنین در مدل‌های ارایه شده ترکیبات مختلفی از قبیل کربونیل آهن، نیتریلو تری‌استات فریک و آهن دکستران استفاده شده است که به دلیل مزایایی از قبیل پایداری در PH بدن، جذب بالا و نیز سمیت کمتر استفاده از آهن دکستران متداول‌تر است [۱۵، ۲۲، ۲۷]. از طرف دیگر در ایجاد اضافه باری آهن روش‌های مختلفی از قبیل خوراکی، تزریق داخل پری‌توان و موش‌های ناکاوت مورد ارزیابی قرار گرفته است و بهترین الگو در این زمینه تزریق داخل پری‌توان می‌باشد چراکه در مدل‌های خوراکی زمان بسیار زیادی (چندین ماه) صرف ایجاد مدل اضافه باری آهن می‌شود و مدل ناکاوت هم دلیل بر هم زدن مسیر طبیعی متابولیسم آهن عملاً برای بررسی برخی شرایط خاص کاربرد

آهن همچنین ترکیبات موثر روی کاهش بیان هپسیدین (بعنوان فاکتور کلیدی کنترل کننده متابولیسم آهن) استفاده نمود.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به داشتن تبحر لازم برای کار با موش‌های آزمایشگاهی اسپراگو و احتمال مرگ موش‌های مورد بررسی در اثر سمیت آهن تزریقی در طولانی شدن مدت زمان آزمایش اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

تزریق داخل صفاقی آهن دکستران به میزان ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم می‌تواند باعث ایجاد اضافه باری آهن و افزایش سطوح سرمی هپسیدین در موش‌های اسپراگو شود و از آن می‌توان به عنوان مدلی برای بررسی راه‌های مقابله با اختلالات متابولیسمی آهن استفاده نمود.

سپاسگزاری

این پژوهش با کد IR.ARUMS.REC.1394.125 و با تامین مالی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شده است. بدینوسیله از واحد پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اردبیل کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References



- Moll R, Davis B. Iron, vitamin B12 and folate. *Medicine*. 2017;45(4):198-203. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.01.007
- Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(2):164.
- Lane D, Merlot A, Huang M-H, Bae D-H, Jansson P, Sahni S, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2015;1853(5):1130-44.
- Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823(9):1434-43. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014
- Puliyel M, Mainous AG, 3rd, Berdoukas V, Coates TD. Iron toxicity and its possible association with treatment of Cancer: lessons from hemoglobinopathies and rare, transfusion-dependent anemias. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:343-51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.861 PMID: 25463277
- Siddique A, Kowdley K. the iron overload syndromes. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2012;35(8):876-93.
- Gattermann N. The treatment of secondary hemochromatosis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2009;106(30):499.
- Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood*. 2016;127(23):2809-13. DOI: 10.1182/blood-2015-12-639112 PMID: 27044621
- Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003;102(3):783-8.
- Nakanishi T, Hasuike Y, Otaki Y, Kida A, Nonoguchi H, Kuragano T. Hepcidin: another culprit for complications in patients with chronic kidney disease? : Oxford University Press; 2011.
- Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:969-74. PMID: 8597169
- Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol*. 2002;76(3):219-28. PMID: 12416732
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235-63. DOI: 10.1002/em.22087 PMID: 28485537
- Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R, Recalcati S, Steffani L, Gatti S, et al. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *Am J Pathol*. 2013; 182(6):2254-63.
- Macchi C, Steffani L, Oleari R, Lettieri A, Valenti L, Dongiovanni P, et al. Iron overload induces hypogonadism in male mice via extrahypothalamic mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;454:135-45. DOI: 10.1016/j.mce.2017.06.019 PMID: 28648620
- Das SK, Patel VB, Basu R, Wang W, DesAulniers J, Kassiri Z, et al. Females Are Protected From Iron-Overload Cardiomyopathy Independent of Iron Metabolism: Key Role of Oxidative Stress. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1). DOI: 10.1161/jaha.116.003456 PMID: 28115312
- Gao W, Zhao J, Gao Z, Li H. Synergistic Interaction of Light Alcohol Administration in the Presence of Mild Iron Overload in a Mouse Model of Liver Injury: Involvement of Triosephosphate Isomerase Nitration and Inactivation. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170350. DOI: 10.1371/journal.pone.0170350 PMID: 28103293
- Duarte TL, Caldas C, Santos AG, Silva-Gomes S, Santos-Goncalves A, Martins MJ, et al. Genetic disruption of NRF2 promotes the development of necroinflammation and liver fibrosis in a mouse model of HFE-hereditary hemochromatosis. *Redox Biol*. 2017;11:157-69. DOI: 10.1016/j.redox.2016.11.013 PMID: 27936457
- Flores SR, Wang X, Ha J, Doguer C, Wang T, Collins JF. Characterization of a Hepcidin Knockout Rat, a Novel Model of Iron Overload. *The FASEB Journal*. 2017;31(1_supplement):637.6-6. DOI: 10.1096/fasebj.31.1_supplement.637.6
- Vu'o'ng Le B, Khorsi-Cauet H, Villegier AS, Bach V, Gay-Queheillard J. New rat models of iron sucrose-induced iron overload. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(7):790-9. DOI: 10.1258/ebm.2011.010298 PMID: 21685238
- Polson CJ. The fate of colloidal iron administered intravenously. Part II: Long experiments. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1929;32(2):247-60. DOI: 10.1002/path.1700320207
- Elmi M, Rahimi-Moghaddam P, Abdi K, Shafiee-Ardestani M, Mahmoodian M. Ciprofloxacin: a novel therapeutic agent for iron overload? *Turk J Haematol*. 2009;26(3):114-7.

23. Hershko C, Link G, Konijn AM, Huerta M, Rosenmann E, Reinus C. The iron-loaded gerbil model revisited: Effects of deferoxamine and deferiprone treatment. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2002;139(1):50-8. DOI: <https://doi.org/10.1067/mlc.2002.120364>
24. Martin L, Bates C, Beresford C, Donaldson J, McDonald F, Dunlop D. The Pharmacology Of An Iron-Dextran Intramuscular Haematinic. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 1955;10(3):375-82. DOI: [doi:10.1111/j.1476-5381.1955.tb00887.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1955.tb00887.x)
25. Obejero-Paz CA, Yang T, Dong WQ, Levy MN, Brittenham GM, Kuryshv YA, et al. Deferoxamine promotes survival and prevents electrocardiographic abnormalities in the gerbil model of iron-overload cardiomyopathy. *J Lab Clin Med*. 2003;141(2):121-30. DOI: [10.1067/mlc.2003.18](https://doi.org/10.1067/mlc.2003.18) PMID: 12577048
26. Schwartz KA, Li Z, Schwartz DE, Cooper TG, Braselton WE. Earliest cardiac toxicity induced by iron overload selectively inhibits electrical conduction. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(2):746-51. DOI: [10.1152/japplphysiol.01144.2001](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01144.2001) PMID: 12133887
27. Bacon BR, Tavill AS, Brittenham GM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest*. 1983;71(3):429-39. PMID: 6826715
28. Loreal O, Haziza-Pigeon C, Troadec MB, Detivaud L, Turlin B, Courselaud B, et al. Hepsidin in iron metabolism. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6(3):279-91. PMID: 15974953
29. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8780-5. DOI: [10.1073/pnas.151179498](https://doi.org/10.1073/pnas.151179498) PMID: 11447267
30. Barton JC, Chen WP, Emond MJ, Phatak PD, Subramaniam VN, Adams PC, et al. GNPAT p.D519G is independently associated with markedly increased iron stores in HFE p.C282Y homozygotes. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;63:15-20. DOI: [10.1016/j.bcmd.2016.11.009](https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.11.009) PMID: 27936396
31. Martinelli AL, Ramalho LN, Zucoloto S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(1):91-8. PMID: 14675249
32. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, et al. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology*. 2001;33(3):647-51. DOI: [10.1053/jhep.2001.22506](https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22506) PMID: 11230745
33. Adams PC, Deugnier Y, Moirand R, Brissot P. The relationship between iron overload, clinical symptoms, and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*. 1997;25(1):162-6. DOI: [10.1002/hep.510250130](https://doi.org/10.1002/hep.510250130) PMID: 8985284
34. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2002;122(2):281-9. PMID: 11832443
35. Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2003;30(2):131-6. PMID: 12957297
36. Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1293-301. PMID: 15131790
37. Rodriguez-Moreno F, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Galindo-Martin L, Hernandez-Torres O, Batista-Lopez N, et al. Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol*. 1997;14(1):39-44. PMID: 9014022
38. Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res*. 2003;533(1-2):153-71. PMID: 14643418
39. Kallianpur AR, Hall LD, Yadav M, Christman BW, Dittus RS, Haines JL, et al. Increased prevalence of the HFE C282Y hemochromatosis allele in women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(2):205-12. PMID: 14973098
40. Shaheen NJ, Silverman LM, Keku T, Lawrence LB, Rohlfs EM, Martin CF, et al. Association Between Hemochromatosis (HFE) Gene Mutation Carrier Status and the Risk of Colon Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(2):154-9. DOI: [10.1093/jnci/95.2.154](https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.154)
41. Mogadam RA, Nemati A, Amani F, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Bashardoust B. Association between hepcidin, haemoglobin level and iron status in stage 4 chronic kidney disease patients with anaemia. *J Pak Med Assoc*. 2015;65(4):354-7. PMID: 25976565
42. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1271-6. DOI: [10.1172/jci20945](https://doi.org/10.1172/jci20945) PMID: 15124018



Research Article

Establishment of Hepatic Iron Overload Model and Its Effect on Serum Hecpidin Levels in Male Sprague Rats

Vadod Malekzadeh ¹ , Farideh Manafi ², Arash Mehri-Pirayvatlo ³, Ali Nemati ⁴, Reza Alipanah- Moghadam ^{5,*} 

¹ Master of Hematology, Department of Anatomical Sciences and Pathology, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

² Master of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

³ Master of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

⁴ Associate Professor of Nutrition, Department of Clinical Biochemistry, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

⁵ Assistance Professor, Department of Clinical Biochemistry, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

* **Corresponding author:** Reza Alipanah- Moghadam, Department of Clinical Biochemistry, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran. E-mail: alipanahreza9@gmail.com

DOI: [10.29252/nkjmd-010029](https://doi.org/10.29252/nkjmd-010029)

How to Cite this Article:

Malekzadeh V, Manafi F, Mehri-Pirayvatlo A, Nemati A, Alipanah- Moghadam R. Establishment of Hepatic Iron Overload Model and Its Effect on Serum Hecpidin Levels in Male Sprague Rats. JNKUMS. 2018; 10 (2): 65-71

URL: <http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1522-fa.html>

Received: 22 Oct 2017

Accepted: 08 May 2018

Keywords:

Iron overload
Sprague rat
Hecpidin

© 2018 North Khorasan
Medical Sciences

Abstract

Introduction: Iron toxicity is caused by the accumulation of iron in different organs, especially the liver, heart and endocrine glands. This disorder causes side effects such as growth retardation, hypogonadism, diabetes, cirrhosis of the liver and heart failure. This study paves the way for identifying the ways of overcoming this disorder through iron overload model.

Methods: In this study, 12 adult male Sprague rats weighing 280-300 g were used. 12 Sprague rats were divided into two groups: control and iron overload groups. To create iron overload, iron dextran was injected. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was used for the examination of iron deposits in the liver tissue. Serum hepcidin levels were measured by ELISA method. Serum iron levels were measured using the photometric method.

Results: The results showed a considerable iron accumulation in liver tissue of the Sprague rats in intervention group compared to the control group. Serum hepcidin (0.22 ± 0.02 versus 0.12 ± 0.01 pg/dl) and iron (258 ± 6.18 versus 186 ± 3.34 mg/dl) levels in the iron overload group were more than that of the control group and both groups had a significant relationship under iron overload conditions ($P < 0.05$).

Conclusions: Intraperitoneal injection of 75 mg/kg iron dextran creates iron overload model and increases serum Hecpidin levels in Sprague rats. This model is used for the investigation of iron metabolism pathways and its disorders.