تأثير زيادة الحديد في الأغذية على انسجة الكبد، الطحال، الكلية والقلب في الفئران

عبد الواحد شمخي جابر ، زهراء كامل زيدان و دينا احمد هاشم
قسم التقانة الاحيائية ، كلية العلوم ، جامعة النهرين

الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية بهدف معرفة تاثير زيادة كمية الحديد المعطى عن طريق الغذاء على الانسيجية لكل من الكبد، الطحال، الكلية والقلب في الفئران المختبرية. استخدم في التجربه ستة عشرة من اناث الفئران السليمة نوع (swiss albino) بعمر ستة اسابيع، قسمت الى اربعة مجاميع، كل مجموعة تحتوي على اربع فئران. تم تغذيه ثلاثة مجاميع منها بغذاء مضافاً له مستويات مختلفه من الحديد هي (40، 80، 120) ملغ/ كغم على التوالي طوال مدة التجربه، اما المجوعة الرابعه فكان غذائها من نفس المصدر ولكن غير مدعم (مجموعة السيطرة). استمرت التجربة لمدة 14 يوماً. قيست اوزان الحيوانات قبل وبعد انتهاء التجربة. في نهاية التجربة اخذت عينات من الدم من كل مجموعة لغرض تقدير نسبة الهيموغلوبين (Hb)وحجم مضغوط الخلايا (PCV).اشرت النتائج وجود فروق معنويه في نسبة الهيموغلوبين وحجم مضغوط الخلايا في كافه مستويات الاضافه. اما من ناحية الانسجه للاعضاء المختلفه فبعد تشريح الحيوانات في المجاميع الاربعة واستحصال الاعضاء المراد دراستها نسيجياً، لوحض ترسب ماده الهيموسدرين (Hemosiderin) في خلايا الكبد والطحال كما لوحظ وجود تنخر في بعض خلايا الكبد في الحيوانات المغذاة على غذاء مدعم بنسب عالية من الحديد ولم يلاحظ تغيرات في انسجة كل من القلب والكلية.

المقدمة

تعاني شعوب عديدة من حالات فقر الدم الناتج عن نقصان بعض العناصر في الغذاء، ويعتبر الحديد من اهم هذه العناصر. يؤدي نقص الحديد الى ما يعرف بفقر دم نقص الحديد (Iron deficiency anemia) [1]. ويتسبب هذا النقصان في انخفاض مستوى كل من الهيموغلوبين (Hb)، وحجم مضغوط الخلايا (P.C.V)، وقد يؤدي الى خفض مخزون الحديد في الكبد ويتبع ذلك انخفاض الحديد في كريات الدم الحمراء المتكونة (Iron deficiency Erythropoises). واذا ماستمر الانخفاض فانه يؤدي الى ظهور ما يعرف بحالة (Hypochronic anemia). والتي تكون فيها كريات الدم الحمراء صغيرة الحجم وذات لون فاتح وغير طبيعي (Microcytic) [2].

أزاء ماتقدم عمدت المنظمات العالمية ممثلة بمنظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الغذاء والزراعة الدولية (FAO)، وكذلك البلدان المختلفة الى معالجة هذه الحالات. قدرت منظمة الصحة العالمية الاشخاص اللذين يعانون من انيميا نقص الحديد باكثر من 2000 مليون شخص على مستوى العالم [3]. وبشكل عام فان نسبة اللذين يعانون من انيميا نقص الحديد في العالم تقدر بحوالي 14% [4]. وقد يعزى السبب الى العوامل البيئية او الغذائية التي ادت الى انتشار هذه الحالات [5]. وفي عام 1996 كان قد عقد المؤتمر الغذائي في عاصمة الفلبين تحت عنوان: (Manila declaration on food fortification)، وفيه تم التاكيد على استخدام الاسلوب العلمي الاقتصادي ووضع قانون ينظم الاضافة للمواد الاساسية في الغذاء ومن ضمنها الحديد،. كما اكدت منظمة الغذاء والزراعة الدولية [6]، على ضرورة اختيار المادة التي يمكن ان تكون ملائمة لنقل المادة المضافة الى المستفيد. عمدت العديد من البلدان مثل عمان، البرازيل وبوليفيا الى اعتماد برامج تدعيم المواد الغذائية بمكونات مختلفة مثل اليود والحديد وفيتامين A، كما اكدت منظمة اليونيسيف (UNICEF) ،[7] ان انجاح برنامج التدعيم يتطلب وجود قوانين واضحة وتدخل حكومي وتعاون المنظمات الدولية ذات العلاقة.

تم تحديد اضافة الحديد بمستوى معين بالاعتماد على الهدف من الاضافة، وكذلك يختلف المنتوج المدعم حسب البلد ففي المغرب اعتمد الملح في التدعيم للاطفال اما في الهند فقد استخدم الرز للاطفال وكذلك استخدمت الحنطة المدعمة في تغذية النساء في تايلند [8]. يعد تدعيم طحين

الحنطة بالحديد وحامض الفوليك من طرق التدعيم الاكثر تسويقاً بالعالم وذلك لكثرة المستخدمين لمنتجات الحنطة وكذلك لسهولة التدعيم. ان تدعيم طحين الحنطة بمادة الحديد في تزايد مستمر، اذ كانت نسبة الطحين المدعم من الانتاج الكلي للطحين 18% عام 2004 وبلغت النسبة 27% عام 2007، [9].

وقد ذهبت منظمة الصحة العالمية الى اعتبار سوء التغذية بمستوى الجوع وتبذل جهود حثيثه لتطوير برامج التدعيم [10]. تعتبر مادة ($FeSO_4$) هي المادة المفضلة في برامج التدعيم المختلفة اذ تضاف بشكل مسحوق ولكن جرت محاولات في وقت لاحق لاعطاء هذه المادة بشكل كبسول وتم تجربة ذلك في الكويت على 279 امرأة بأعمار بين 18-35 سنة ولوحظ ان مخزون الجسم من الحديد قد ازداد في حالة اعطاء الكبريتات على شكل كبسول مع اعطاءه عن طريق البسكويت المصنع من طحين الحنطة، [11].

في الوقت الذي تتصاعد فيه الدعوات من كافة المنظمات المهتمة بالامور الصحية بأضافة الحديد لتدعيم الاغذية لمعالجة فقر الدم الناتج عن نقص الحديد، في نفس الوقت يجب التركيز على ان كمية الحديد المضافة يجب ان تكون ضمن حدود معينة لان الكميات الزائدة سوف يكون لها مردود سلبي ولايقل خطورةً عن نقصه بل من الممكن ان يتعدى ذلك الى احداث مجموعة من الاضرار الصحية مثلا الاصابة بالسرطان (Cancer) وامراض القلب (heart attack) وبعض الامراض الاخرى مثل امراض الكبد والسكر، [12،13،14،15،16]. كما تؤثر زيادة الحديد على الامعاء ايضا، اذ وجد ان زيادة كمية الحديد في الغذاء المستخدم في تغذية الفاران لمدة 24 اسبوعا ادت الى ظهور الـ Tumor cells في اجزاء من الامعاء [17].

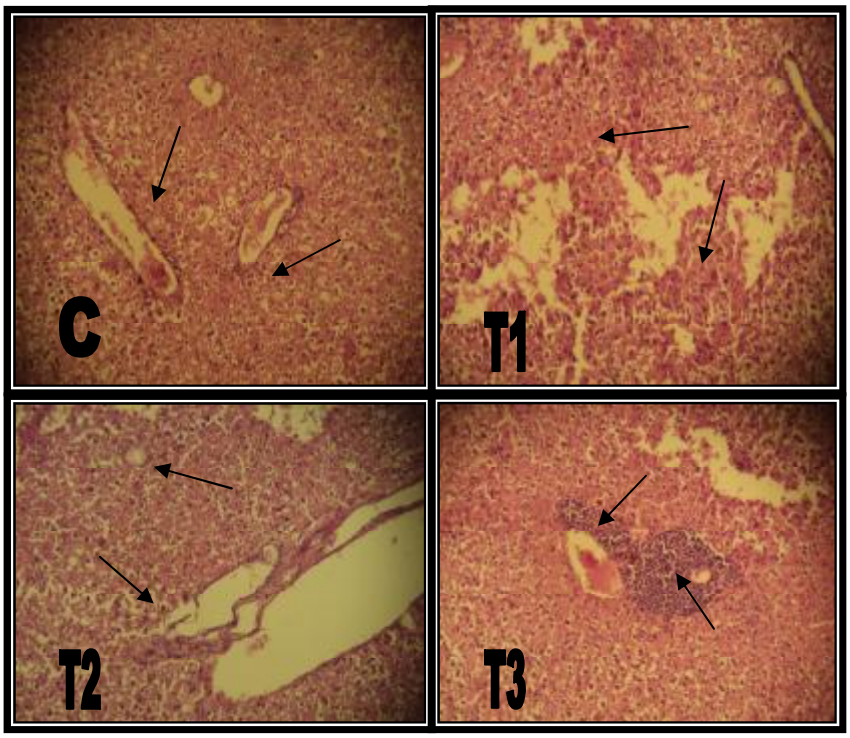
المواد وطرائق العمل

استخدم في التجربه ست عشرة من اناث الفئران السليمة، قسمت الى اربع مجاميع كل مجموعه احتوت اربع من اناث الفئران. اسخدمت كبريتات الحديدوز ($FeSO_4$) كمصدر للحديد وتم اضافتها الى الطحين (استخلاص 72% الذي تم الحصول عليه من السوق المحلية) بنسب (40،80 ،120 ملغ/كغم) على التوالي اذ كان المستويين (80و120) اعلى من النسبه الموصى بها في دراسه سابقه والبالغة (50 ملغم/كغم) [18]. تم اعداد الخبز من ذلك الطحين الحاوي على نسب الحديد المختلفة. غذيت المجاميع الثلاثه من اناث الفئران السليمة على الخبز المعد من الطحين المدعم بالحديد طوال مدة التجربه البالغة 14 يوما اما المجموعة الرابعة فغذيت على خبز معد من نفس الطحين ولكن بدون تدعيم. قيست اوزان الحيوانات في بداية التجربة، وبعد انتهاء فترة التجربة ثم تم استحصال الدم منها عن طريق السحب من القلب (heart puncture) لغرض اجراء قياس كل من نسبة الهيموغلوبين بالدم (Hb) وحجم مضغوط الخلايا. اتبعت الطريقة الاعتيادية في قياس خضاب الدم والمعروفة بطريقة ساهلي (Sahlis method)، اذ سحبت عينة الدم بواسطة الماصة الخاصة واضيفت الى انبوبة الاختبار التي تحوي على HCL (0.1) عياري وبعد ان مزجت محتويات الانبوبة، تركت لمدة 5 دقائق ومن ثم اضيف الماء المقطر (قطرة قطرة) الى المزيج (الدم والحامض) مع موازنة لون المزيج مع لون الانبوبتين الطرفيتين الخاصة بالجهاز ومن ثم اخذت قرأتان لكل نموذج واستخرج المعدل. اما حجم مضغوط كريات الدم الحمر (PCV) تم بأستخدام انابيب شعرية طولها 7.5 سم وقطرها الداخلي حوالي (1مليمتر) وملئت ثلثي الانبوبة بالدم باسلوب الخاصية الشعرية ثم سد احد طرفيها بالطين الاصطناعي و وضعت في جهاز الطرد المركزي للانابيب الشعرية (Micro-centrifuge) لمدة 5 دقائق، قيس بعدها الحد الفاصل بين البلازما والدم بواسطة مسطرة قياس خاصة. بعد ذلك تم التضحية بالحيوانات لغرض جمع عينات كل من الكبد ،الطحال، الكلية والقلب. وضعت تلك الاعضاء في اطباق حاوية على محلول ملحي فيسيولوجي لغرض تنظيفها من بقايا النسيج الدهني المحيط بها، ومن ثم حفضت بانابيب اختبارية تحوي على مادة الفورمالين بنسبة 10% لمدة تتراوح بين 160-180 ساعة وذلك لغرض التثبيت بعدها نقلت الى انابيب اختبارية حاوية على كحول بنسبة 70% لحفظها لحين وقت استخدامها، بعدها اخذت عينات الانسجة الى مختبرات الصحة التعليمية في بغداد اذ تم نقلها الى انابيب حاوية على الايثانول بنسبة

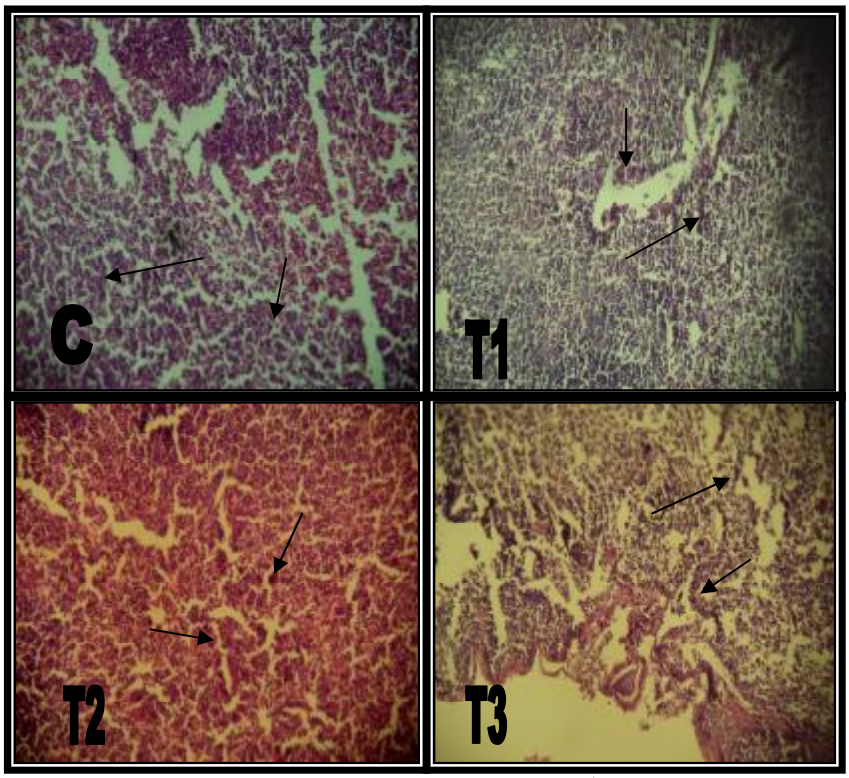
90% لمدة 6 ساعات ثم نقلت الى انابيب تحوي على نسبة 99% من الكحول ولمدة 6 ساعات ومن ثم وضعت بمادة الـــ Xylol لمدة ساعاتين، وبعد ذلك صبت الاعضاء بقوالب شمعية وقطعت الى شرائح يقدر سمكها بحوالي 5 مايكرون بواسطة جهاز الـــ Microtome المدار يدوياً. وضعت هذه الشرائح في حمام مائي دافء تبلغ حرارته 45 درجة مئوية لثواني ثم لصقت على شرائح زجاجية بزاوية مائلـــة لتبـــدا بعـــــدها مرحلـــة التصبيغ بأستخدام صبغة Hematotoxilin and Eosin اخذت صور للشرائح النسيجية بأستخدام الكاميرا الرقمية تحت المجهر الالكتروني وبقوة تكبير 400x و100x. أستخدام برنامج (SPSS 7.5) الاحصائي في مقارنة النتائج وتاشير الفروقات المعنوية بين المجاميع تحت الدراسة.

النتائج والمناقشة

كما هو معلوم فان جميع خلايا الجسم تحتاج الى عنصر الحديد[19] ، اما لغرض ادامه الحيات (survival) او قد يدخل مع عمل بعض الانزيمات (cofactor). في نفس الوقت فان زيادة كمية الحديد تجعله عنصرا ضارا (toxic) وذلك من خلال قابليته على تكوين الجذور الحره (free radical) وما قد تحدثه من اضرار في خلايا الجسم المختلفة [20]. ان الزياده في كميات الحديد في الغذاء تشكل خطورة وخاصة في امراض الاوعية الدموية وعلاقة ذلك بما يعرف بالضربة القلبية (heart attack) [16]. ينقل الحديد بواسطة نوع من البروتين الذي يصنع في الكبد ويعرف بـــ (Transferritin) الى خلايا الجسم التي تحتاجه في الاعمال الحيويه المختلفة، وعادة هذا البروتين يقوم بامتصاص الحديد بشكل مباشر من الامعاء. هناك مركب اخر موجود في خلايا الجسم المختلفه ويعرف بـــ (Ferritin) يقوم بتخزين كميات الحديد الفائض عن حاجة الجسم وتختلف سعه الخزن حسب العمر والجنس وبصورة عامة تتراوح بين 15 الى 300 نانوغرام/ مليتر (300-15 ng/ ml) من السيرم [16]. وعندما يصبح الجسم عاجز عن تخرين الحديد على شكل (Ferritin) فانه يترسب على شكل مايعرف بالهيموسدرين (hemosiderin) وهو عبارة عن نوع اخر من البروتين. هذة المادة عادة تترسب بشكل رئيسي في الكبد ومن ثم في الطحال [20]. وهذا ما وجدناه في هذه الدراسه اذ يلاحظ في الشكل (1) ان ماده الهيموسدرين (hemosiderin) قد ترسبت في خلايا الكبد وكذلك حدث تنخر وارتشاح في الخلايا الكبدية وهو متفق مع ماتوصل اليه بعض الباحثين [22،21]. ويعتبرالكبد اهم الاعضاء التي يؤثر عليها زيادة الحديد كونه العضو الذي يخزن فيه الحديد [14]. كذلك فان وجود زيادة من الحديد يجعل الشخص اكثر عرضه لاحتمالات الاصابه بالسرطان او تليف في الكبد [23]. اما الشكل (2) فانه يؤشر ايضا وجود ترسب لمادة الهيموسدرين في خلايا الطحال. ولكن لم نلاحظ حدوث تغيرات في انسجة القلب او الكلية.



شكل(1) مقطع في كبد الفئران للمجاميع (C) مجموعة السيطرة يوضح التركيب الطبيعي للكبد وكما هو موضح بالاسهم (T1). مجموعة المعاملة الاولى: نلاحظ ظهور ترسبات لمادة الهيموسدرين في في داخل الخلايا الكبدية والبلعمية بنسبة قليلة. (T2) مجموعة المعاملة الثانية فتظهر ترسبات الهيموسدرين بنسبة اكبر داخل الخلايا الكبدية والبلعمية.
(T3) مجموعة المعاملة الثالثة توضح ظهور ترسبات لمادة الهيموسدرين في داخل الخلايا الكبدية والبلعمية مع تنخر وارتشاح الخلايا الكبدية وبقوة تكبير 400X و 100X كما استخدمت صبغة Eosin and Hematotoxilin.



شكل(2) مقطع في الطحال الفئران (C) مجموعة السيطرة يوضح التركيب الطبيعي للطحال وكما هو موضح بالاسهم. (T1) مجموعة المعاملة الاولى يوضح ترسبات مادة الهيموسدرين بين الخلايا البلعمية للطحال ولكن بنسبة قليلة. (T2) مجموعة المعاملة الثانية تظهر ترسبات الهيموسدرين بنسبة اكبر. (T3) مجموعة المعاملة الثالثة يوضح التلف الحاصل لخلايا الطحال مع الترسبات الظاهرة

للهيموسدرين بين الخلايا وكما هو موضح من خلال الاسهم. وبقوة تكبير 400X و 100X كما استخدمت صبغة Eosin and Hematotoxilin.

كما اظهرت النتائج المستحصل عليها في الجدول رقم (1) عدم وجود فروقات معنويه في اوزان الحيونات المغذاة على الغذاء غير المدعم اما الحيونات التي غذيت على الغذاء المدعم فكان هناك فروقات معنويه بين الاوزان عند بداية التجربة و بعد الانتهاء منها، اذ حدث نقص في الاوزان في كافة المعاملات وهذا قد يكون نتيجة لترسب كميات من الهيموسدرين في الكبد و ما حدث من تنخر في بعض الخلايا و كذلك الطحال وما حدث به من اضرار وهذا بدوره قد يكون اثر على عمليات التمثيل الغذائي في اجسام تلك الحيونات وبالتالي تسبب في نقص الوزن. الجدول رقم (2) اوضح وجود زيادة معنويه في نسبه الهيموغلبين (Hb) وحجم مضغوط الخلايا (PCV) وعند وضع تلك النتائج بشكل منحنى كما في الاشكال (4،3) اذ يلاحظ ان الزيادة تاخذ شكلا خطيا تصاعديا وهذا يتفق مع توجهات اضافة الحديد الى الغذاء لمعالجه فقر دم نقص الحديد من خلال النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة نوصي بتوخي الدقه والحذر في عمليات التدعيم ويجب ان تتم تحت اشراف المختصين ووجود اشراف مختبري دقيق.

جدول رقم (1)

اوزان الحيوانات قبل وبعد التجربة.

المجاميع	وزن الجسم قبل التجربة	وزن الجسم بعد التجربة
مجموعة السيطرة(C) مغذات على خبز من طحين غير مدعم بالحديد	29.67±0.83a	*29.93±1.08
مجموعة المعاملة الاولى (T1) مغذات على خبز من طحين مدعم 40 ملغ /كغم حديد	26.70±1.77 c	*22.65±0.93
مجموعة المعاملة الثانية (T2) مغذات على خبز من طحين مدعم 80 ملغ / كغم حديد	28.00±0.76 d	*26.70±0.69
مجموعة المعاملة الثالثة (T3) مغذات على خبز من طحين مدعم 120 ملغ / كغم حديد	29.35±2.38 e	* 24.29±0.65

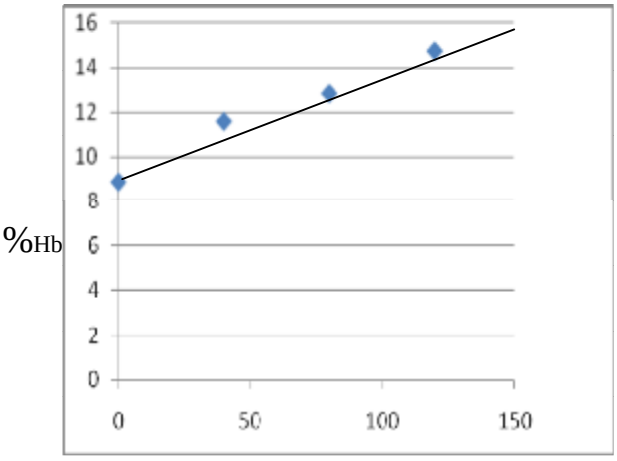
***هنالك فرق معنوي لوزن الجسم في بدء التجربة عنه في نهايتها القيم ذوات الاحرف المختلفة تفرق فرقاً معنويا عن مجموعة السيطرة.**

جدول رقم (2)

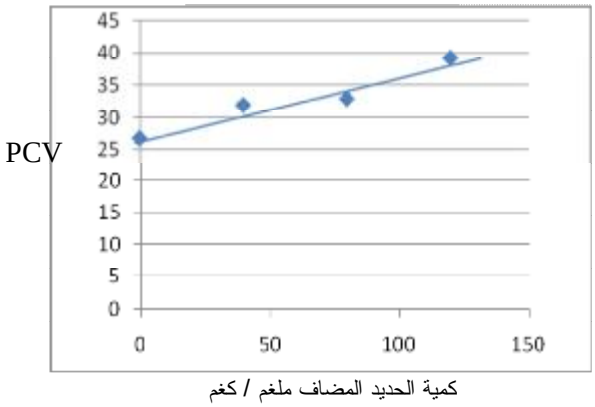
نسبة الهيموغلوبين (Hb) وحجم لمجاميع لحيوانات التجربه المختلفه مضغوط الخلايا (PCV).

المجاميع	Hb	PCV
مجموعة السيطرة(C) مغذات على خبز من طحين غير مدعم بالحديد	8.9±0.12 a	26.76±0.63a
مجموعة المعاملة الاولى (T1) مغذات على خبز من طحين مدعم 40 ملغ /كغم حديد	11.63±0.52 b	31.93±1.31 b
مجموعة المعاملة الثانية (T2) مغذات على خبز من طحين مدعم 80 ملغ /كغم حديد	12.86±0.28 c	32.93±1.79 B c
مجموعة المعاملة الثالثة (T3) مغذات على خبز من طحين مدعم 120 ملغ /كغم حديد	14.76±0.55 d	39.30±2.33 d

القيم ذوات الاحرف المختلفة تفرق فرقاً معنويا عن مجموعة السيطرة.



شكل (3) زيادة نسبة الهيموغلوبين في الدم مع زيادة الحديد المضاف.



شكل (4) زيادة حجم مضغوط الخلايا في الدم مع زيادة الحديد المضاف.

References

[1] R.J.Merx,; M. Lotif,. "Micronutrent fortification of food" current practices, research and opportunities, 1996. p2,14,44.

[2] M.Olivares, "Nutritional Anemias". Clinical Nutrition of yong Chid,Vol. 2, 1995, Nestic. Ltd Vevey/ Rauen. Ltd New York

[3] WHO, "Indicator and strategies for iron deficiency anemia programs". Raft report of the WHO/UNICEF consultation. Geneva 6-10 December 1993. WHO, Geneva, Switzerland (C.F, Mert and Lotfi,) pplementation. J.Trace Element in Medicine and Biology, Vol.12, 1996, pp129- 140.

[4] L.H.Allen and S.R. Gillespie, "A review of the Efficacy and Effectiveness of Nutrition Intervention ".U.N., 2001, (ACC/ SCN).

[5] K. Schumann,; B. Elsenhans and A. Maurer, "Iron supplementation", J.Trace Element, in Medicine and Biology, Vol.12,1998, pp129-140.

[6] FAO," Food Fortification Technology and Quality Control", Rep. of FAO Teachincal meeting, Rome Italy, 1995.

[7] UNICEF "Making food enrichmen programmes sustainable". The state of World Children, 1998, Panel 17

[8] R.F. Hurrell," Iron fortification: its efficacy and safety in relation to infections".Food Nutr Bull; 28(4 supply), 2007, S585-94.

[9] Morbidity and Mortality Weekly Report, "Trends in wheat –flour fortification with folic acid and Iron" Worldwide. January 57(01), 2008, p8-10.

[10] World Health Organization. "Nutrition for Health and Development", 2009.

[11] R.Biebinger,;M.B.; Zimmerman,; S.N. Al-Hooti,; N. Al-hamed,; E.Al- Salem,; T. Zafar; Y. Kabir,; I. Al- obaid,; N. Petry and R. F. Hurrell, "Efficacy of wheat based biscuits fortified with microcapsules containing ferrous sulfate and potassium iodate or a new hydrogen–reduced elemental iron: a randomised, double-blind, controlled trail in Kuwaiti women". Br.J.Nutr.5, 2009, p1-8.

[12] V. Alex."(why men store this nutrient in their bodies and the harm that it dose)", Men Web – Men's Voices. 1996.

[13] MJ. Arthur, "Iron overload and liver fibrosis", J. Gastroenterol Hepatol.; 11(12), 1996, p 1124-9.

[14] H.L. Bonkovsky and R.W. Lambrecht, "Iron- induced liver injury", Clin Liver Dis; 4(2), 2000, p 409-29.

[15] S.Johnson, "Iron catalyzed oxidative damage, in spite of normal ferritin and transferrin saturation level and its possible role in Werners syndrome,Parkinsons disease, cancer, gout, rheumatoid arthritis, etc", Med Hypotheses,55(3), 2000, p 242-4.

[16] R. Leo and M. D. Zacharski, "The toxicity of excess dietary iron, " Dartmouth-Hitchcock, NORRIS COTTON CANCER CENTER Cancer Research, 2002.

measure the hemoglobin (Hb) and the pursuer of cell volume (PCV) by bleeding through heart puncture. Mice in all the groups were then sacrificed and slides from the tissues of heart, kidney, liver and spleen had been made. Results showed that there is a significant difference in weight table (1) and in (Hb) and (PCV) table (2) between mice feed with fortified food and unfortified. In the same time slides of livers and spleens showed that there were a few precipitate of hemosidren in their cells and also some damage in the liver cell of the mice feed with food has high level of iron. But we cannot recognize any effect on the tissues of the heart and kidney.

[17] S. James, "The influence of dietary iron on intestinal tumorgenesis, using immunohisochemistry, proteomics and gene expression analysis". Case Western University, EST 1826, 2008.

[18] Salih, F. A.; Al-norri F. F,: Jabir A. Sh. (2004). "Fortification of bead by iron to treated iron deficiency anemia". The second Arabic conference for nutrition, Almnama, Alba ran King Dum, December 7-9 – 2004. Arabic J. for food and Nutrition, No 11, 2004, pp 190-196

[19] T.Moos, "Brain iron homeostasis", Dan Med Bull, 49(4), 2002, p 279-301.

[20] P. Emilie,; G.F. Isabelle,; J. Laurent,; Florina, G.; B.C. Franci,: C. Yves and J. Jean- Claude, "The protective role of transferring in muller glial cell after iron-induced toxicity", Mol Vis 14, 2008, p928-941.

[21] D. A. Papanastasiou,; D.V. Vayenas,; A. Vassilopoulos and M. Repanti, " Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs", Pathol Res Pract,196 (1), 2000, p 47-54.

[22] T. Matsuno,; M. Mori and M. Awai, "Distrution of ferritin and hemosiderin in the liver, Spleen and bone marrow of normal, phlebotomized and iron overloaded rats". Acta. Med Okayama, 39(5), 1985, p 347-60.

[23] S.Fargion,; M.Mattioli,; A.L Fracanzani and G.Fiorelli, "Iron and liver diseases",Can J Gastroenterol, 14suppl, 2000, D:89D-92D.

Abstract

This study has been design to estimate the histological effect of iron in food on the tissue of liver, spleen, kidney and heart. Sixteen healthy female mice with age of six week were used. Mice were divided in four groups. Three groups were feed with fortified food with iron and the other groups were feed with the same source of food but unfortified with iron. Three level of fortification were used (40, 80, and 120,) mg/kg. Same food was used during the time of the experiment. At the end of the experiment, samples of blood were taken to