

Anna TARKOWSKA

**Zależność między porą dnia a odkładaniem się  $^{59}\text{Fe}$   
w krwinkach czerwonych, szpiku kostnym, wątrobie, śledzionie i nerkach  
u zdrowych szczurów**

Зависимость между временем дня и отложением  $^{59}\text{Fe}$  в красных кровяных  
тельцах, костном мозге, печени, селезенке и почках у здоровых крыс

The Relationship between Time of Day and  $^{59}\text{Fe}$  Incorporation of Red Blood Cells,  
Bone Marrow, Liver, Spleen and Kidneys in Normal Rats

W poprzednim doniesieniu (15) opisaliśmy obserwowane przez nas u szczurów rasy Wistar dzienne wahania poziomu żelaza we krwi i utajonej zdolności wiązania tego pierwiastka przez białka surowicy (uzwż). Zgodnie ze spostrzeżeniami szeregu innych autorów stwierdziliśmy, że wieczorem (godz. 19.00—20.00) poziom żelaza jest istotnie niższy, a uzwż istotnie większa aniżeli rano (godz. 7.00—8.00). Celem obecnej pracy było zbadanie, czy powyższym wahaniom sideremii towarzyszą zmiany w ilości żelaza radioaktywnego opuszczającego osocze i przedostającego się do takich narządów, jak szpik kostny, wątroba, śledziona i nerki, oraz ulegającego wbudowaniu do krwinek czerwonych w procesie ich dojrzewania.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania wykonano na szczurach płci męskiej rasy Wistar, o c. ciała 231 g — — 296 g. Wszystkie zwierzęta w ciągu przynajmniej 2 tygodni poprzedzających badanie znajdowały się w takich samych warunkach hodowlanych, przy czym karmione były one wodą i standardową paszą podawaną w nieograniczonych ilościach. W ciągu dnia szczury przebywały w pomieszczeniach ruchliwych i z dostępem światła słonecznego. W nocy pomieszczenia te były ciemne i ciche. Szczurom podawano do żyły ogonowej 1  $\mu\text{Ci}$  cytrynianu  $^{59}\text{Fe}$  w izotonicznym, sterylnym i apyrogenym roztworze o objętości 0,5 ml. Aktywność właściwa wymienionego radioizotopu wynosiła ok. 50  $\mu\text{Ci}$  na 1  $\mu\text{g}$  żelaza. U 14 szczurów o c. średnio 259 g iniekcji dokonywano rano, między godz. 7.00 a 8.00. U 15 zwierząt o c. średnio 256 g radioaktywne żelazo wstrzykiwano wieczorem — między godziną 19.00 a 20.00. Po 12

godzinach po iniekcji  $^{59}\text{Fe}$ , a więc odpowiednio w godz. 19.00—20.00 wieczorem i w godz. 7.00—8.00 rano, zwierzęta usypiano eterem i skrwawiano całkowicie, pobierając krew z serca. Następnie izolowano i dokładnie ważono wątrobę, śledzionę, nerki i kości udowe, te ostatnie po starannym oczyszczeniu z przyklejonych do nich mięśni i innych tkanek miękkich. Aktywność każdego z wymienionych narządów w całości i aktywność próbek krwi mierzono przy pomocy zestawu składającego się z licznika studzienkowego USB-2 oraz przelicznika ZPR-2, sterowanego czasosterelem CS-3.

Z wyników pomiarów wyliczono, jaki procent podanej dawki  $^{59}\text{Fe}$  uległ w danym okresie czasu nagromadzeniu w krwinkach czerwonych oraz w każdym z badanych narządów w przeliczeniu na 1 g jego ciężaru. Zawartość  $^{59}\text{Fe}$  w kościach udowych traktowano jako miernik zawartości tego izotopu w szpiku kostnym. Przy określaniu procentowej inkorporacji żelaza radioaktywnego w krwinkach czerwonych przyjmowano, że objętość krwi szczurów wynosi 7% c. ciała (1). Dla każdego z badanych parametrów wyliczono wartość średnią i odchylenie standardowe. Istotność różnic między wynikami pomiarów materiału pobranego rano i wynikami pomiarów materiału pobranego wieczorem określano przy pomocy testu  $t$  Studenta (3).

#### WYNIKI BADAŃ

Wyniki pomiaru inkorporacji  $^{59}\text{Fe}$  do erytrocytów w ciągu 12 godzin dnia (od 7.00—8.00 do 19.00—20.00) i w ciągu 12 godzin nocy (od 19.00—20.00 do 7.00—8.00) przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Inkorporacja  $^{59}\text{Fe}$  do erytrocytów szczurów po 12 godzinach po dożylniej iniekcji wykonanej rano (dzień), oraz wykonanej wieczorem (noc) (wyrażone jako % podanej dawki)

$^{59}\text{Fe}$  incorporation of erythrocytes in rats 12 hours after i.v. injection administered in the morning (day) and in the evening (night) (expressed as percent of injected dose)

Pora dnia	Liczba szczurów	Ciężar szczurów (g) średnio	Inkorporacja $^{59}\text{Fe}$ do erytrocytów		Statystyczne porównanie	
			$\bar{x}$	$\pm\sigma$	$t$	$P$
Dzień	14	259,0	20,38	7,14	0,06	$P > 0,1$
Noc	15	256,1	20,23	6,04		

$\bar{x}$  — średnia arytmetyczna,  $\sigma$  — odchylenie standardowe,  $t$  — wartość funkcji testowej,  $P$  — prawdopodobieństwo.

$\bar{x}$  — mean,  $\sigma$  — standard deviation,  $t$  — test function value,  $P$  — probability.

Jak widać z tej tabeli, w obu wymienionych okresach czasu wbudowywanie żelaza radioaktywnego do krwinek czerwonych było podobne ( $P > 0,1$ ). W tab. 2 podano wyniki pomiarów zawartości  $^{59}\text{Fe}$  w kościach udowych. Stwierdzono, że w ciągu dnia, w okresie pomiędzy godz. 7.00—8.00 a godz. 19.00—20.00, w szpiku kostnym zawartym w kościach udowych ulega nagromadzeniu większa ilość radioaktywnego żelaza aniżeli w nocy pomiędzy godz. 19.00—20.00 i godz. 7.00—8.00. Różnica między tymi

Tab. 2. Zawartość  $^{59}\text{Fe}$  w szpiku kości udowych szczurów po 12 godzinach po dożylniej iniekcji wykonanej rano (dzień), oraz wykonanej wieczorem (noc) $^{59}\text{Fe}$  content in the femoral bone marrow of rats 12 hours after i.v. injection administered in the morning (day) and in the evening (night)

Pora dnia	Liczba szczurów	Ciężar szczurów (g) średnio	$^{59}\text{Fe}/1\text{ g}$ kości udowej $\bar{x}$	% $\pm\sigma$	Statystyczne porównanie t	P
Dzień	14	259,0	2,836	$\pm 0,715$	1,74	0,1 > P > 0,05
Noc	15	256,1	2,396	$\pm 0,642$		

Objaśnienia skrótów jak w tab. 1 (abbreviations like in tab. 1).

Tab. 3. Zawartość  $^{59}\text{Fe}$  w wątrobie szczurów po 12 godzinach po dożylniej iniekcji wykonanej rano (dzień), oraz wykonanej wieczorem (noc) $^{59}\text{Fe}$  content in the liver of rats 12 hours after i.v. injection administered in the morning (day) and in the evening (night)

Pora dnia	Liczba szczurów	Ciężar szczurów (g) średnio	Ciężar wątroby (g) średnio	% $^{59}\text{Fe}/1\text{ g}$ wątroby $\bar{x}$	$\pm\sigma$	Statystyczne porównanie t	P
Dzień	14	259,0	3,50	1,105	$\pm 0,271$	5,12	P < 0,001
Noc	15	256,1	3,10	0,686	$\pm 0,1805$		

Objaśnienia skrótów jak w tab. 1 (abbreviations like in tab. 1).

Tab. 4. Zawartość  $^{59}\text{Fe}$  w śledzionie szczurów po 12 godzinach po dożylniej iniekcji wykonanej rano (dzień), oraz wykonanej wieczorem (noc) $^{59}\text{Fe}$  content in the spleen of rats 12 hours after i.v. injection administered in the morning (day) and in the evening (night)

Pora dnia	Liczba szczurów	Ciężar szczurów (g) średnio	Ciężar śledziony (g) średnio	% $^{59}\text{Fe}/1\text{ g}$ śledziony $\bar{x}$	$\pm\sigma$	Statystyczne porównanie t	P
Dzień	14	259,0	1,00	3,720	1,720	2,36	0,05 > P > 0,02
Noc	15	256,1	0,86	2,525	0,916		

Objaśnienia skrótów jak w tab. 1 (abbreviations like in tab. 1).

wartościami jest zbliżona do istotnej ( $0,1 > P > 0,05$ ). Również w wątrobie stwierdzono znacznie większe odkładanie się radioaktywnego żelaza w ciągu dnia niż w ciągu nocy. Różnice między uzyskanymi wartościami były tu o wiele wyższe aniżeli analogiczne różnice w wynikach pomiarów kości udowych i statystycznie miały charakter wysoce istotny ( $P < 0,001$ ) (tab. 3). Podobne wyniki dało określanie zawartości  $^{59}\text{Fe}$  w śledzionie (tab. 4) i w nerkach (tab. 5). W okresie pomiędzy godz. 7.00—8.00 i godz. 19.00—20.00 do obu tych narządów przedostało się z osocza znacznie więcej radio-

Tab. 5. Zawartość  $^{59}\text{Fe}$  w nerkach szczurów po 12 godzinach po dożylniej iniekcji wykonanej rano (dzień), oraz wykonanej wieczorem (noc)  
 $^{59}\text{Fe}$  content in the kidneys of rats 12 hours after i.v. injection administered in the morning (day) and in the evening (night)

Pora dnia	Liczba szczurów	Ciężar szczurów (g) średnio	Ciężar nerek (g) średnio	% $^{59}\text{Fe}/1$ g nerek $\bar{x}$	$\pm\sigma$	Statystyczne porównanie t	P
Dzień	14	259,0	1,90	0,54	$\pm 0,164$	2,72	0,02 > P > > 0,01
Noc	15	256,1	1,97	0,40	$\pm 0,103$		

Objaśnienia skrótów jak w tab. 1 (abbreviations like in tab. 1).

aktywnego żelaza aniżeli w okresie pomiędzy godz. 19.00—20.00 a godz. 7.00—8.00. Różnice pomiędzy wynikami odpowiednich pomiarów zarówno śledziona, jak i nerek były statystycznie istotne ( $0,05 > P > 0,02$ ;  $0,02 > P > 0,01$ ).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W badanej przez nas grupie szczurów inkorporacja  $^{59}\text{Fe}$  do erytrocytów była podobna w ciągu 12 godzin dnia, obejmujących okres od godz. 7.00—8.00 rano do godz. 19.00—20.00 wieczorem, i w ciągu 12 godzin nocy, to jest w okresie między 19.00—20.00, a 7.00—8.00 godz. rano. Spostrzeżenie to dowodzi, że w obserwowanych porach doby, w których, jak to stwierdzono uprzednio (15), miały miejsce istotne wahania poziomu żelaza we krwi, zużywanie tego pierwiastka do produkcji hemoglobiny, a tym samym nasilenie procesu erytropoetycznego, nie ulegało zmianie. Podobne wyniki uzyskiwali również inni autorzy (7, 16). Na tej podstawie można przyjąć, że występujące w ciągu doby wahania poziomu Fe nie są zależne od różnic w czynności układu krwiotwórczego i intensywności syntezy hemoglobiny. Powyższe obserwacje i oparte na nich wnioski przemawiają przeciwko słuszności poglądu Patersona (10), według którego dzienne wahania sideremii są następstwem odpowiednich zmian w syntezie hemoglobiny i ilości zużytego przy tym żelaza.

Odkładanie się  $^{59}\text{Fe}$  w wątrobie, śledzionie, nerkach i szpiku kostnym było w naszym materiale znacznie większe w ciągu 12 godzin dnia (w okresie między 7.00—8.00 rano a 19.00—20.00 wieczorem), aniżeli w ciągu 12 godzin nocy (w okresie między 19.00—20.00 wieczorem a 7.00—8.00 rano). Zwiększone gromadzenie się żelaza w wymienionych narządach następowało więc w tym samym czasie, w którym poziom tego pierwiastka we krwi ulegał obniżeniu (15). Natomiast podwyższeniu się sideremii towarzyszyło mniejsze odkładanie się Fe w tkankach. Spostrzeżenie to dowodzi, że zachodzące w ciągu doby regularne wahania sideremii wiążą się z od-

powiednimi zmianami w ilości żelaza opuszczającego osocze. W konsekwencji upoważnia to do przyjęcia hipotezy, że odpływ żelaza z osocza odgrywa w rozwoju tych wahań istotną rolę przyczynową. Na występowanie w ciągu doby regularnych istotnych zmian w wielkości odpływu żelaza z krwi oraz na istnienie zależności między tymi zmianami a wahaniami sideremii wskazują również badania półokresu znikania  $^{59}\text{Fe}$  z osocza oraz osoczewego obrotu tego pierwiastka (PIT), przeprowadzone przez Patersona (10) i Locknera (7). Podobny pogląd reprezentuje także Schäfer (14), którego zdaniem dzienne wahania poziomu żelaza zależą od intensywności wychwytywania tego pierwiastka przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego śledziony i wątroby. Również Vacek i wsp. (16) są zdania, że obniżanie się poziomu żelaza w ciągu dnia wynika ze zwiększonego zapotrzebowania tkanek na ów pierwiastek. Interpretacja wyników tych autorów jest jednak o tyle trudna, że badając odkładanie się  $^{59}\text{Fe}$  w śledzionie myszy stwierdzili oni, odwrotnie niż w naszym materiale, większe nasilenie tego procesu w nocy aniżeli w dzień, przy podobnym do obserwowanego przez nas przebiegu zmian sideremii.

Uzyskane przez nas wyniki, dowodząc występowania w ciągu doby istotnych wahań w ilości żelaza opuszczającego osocze i wskazując na przyczynową rolę tych wahań w rozwoju rytmicznych zmian poziomu Fe we krwi, nie wykluczają jednak współistnienia odpowiednich różnic w dopływie żelaza do osocza i ich dodatkowego wpływu na zmieniające się wartości sideremii. Za współudziałem takich mechanizmów przemawiają badania Brodana i wsp. (2), Laurella (6) oraz Lyncha i wsp. (8). Obserwowane przez nas zmiany zawartości żelaza były największe w wątrobie ( $P < 0,001$ ), mniejsze w śledzionie i nerkach (odpowiednio:  $0,05 > P > 0,02$ ;  $0,02 > P > 0,01$ ), a najmniejsze, na granicy istotności, w szpiku kostnym ( $0,1 > P > 0,05$ ). Powyższe wyniki przemawiają przeciwko słuszności poglądów umiejscawiających tzw. labilną pulę żelaza pozaosoczewego wyłącznie lub prawie wyłącznie w szpiku kostnym i/lub wątrobie (4, 5, 11, 12, 13). Otrzymane przez nas wyniki wydają się potwierdzać słuszność hipotezy Najana i wsp. (9), według której jednorodna pula żelaza wymiennego rozprzestrzeniona jest w całym organizmie. Należy przy tym podkreślić, że ustalając rozmieszczenie tej puli Najan i wsp. określali zawartość żelaza w szpiku kostnym, wątrobie, śledzionie i jelitach. Natomiast rola nerek jako miejsca przejściowego odkładania się żelaza w dostępnym nam piśmiennictwie dotychczas nie była wykazywana.

## Wnioski

1. Inkorporacja  $^{59}\text{Fe}$  do krwinek czerwonych nie ulega w ciągu doby istotnym zmianom.

2. Dienne wahania poziomu żelaza we krwi nie mają związku z przebiegiem procesu syntezy hemoglobiny i produkcji krwinek czerwonych.

3. Przechodzenie  $^{59}\text{Fe}$  z osocza do wątroby, śledziony, nerek i szpiku kostnego jest znacznie większe w ciągu dnia aniżeli w ciągu nocy.

4. Zachodzące w ciągu doby regularne wahania poziomu żelaza we krwi zależą od zmian w wielkości dopływu tego pierwiastka z osocza do tkanek.

5. Przestrzeń, do której przechodzi opuszczające osocze żelazo, mieści się nie tylko w szpiku kostnym i wątrobie, ale również i w innych narządach, jak śledziona i nerki.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Barański S., Czerski P., Krzemińska-Ławkowicz I., Krzymowski T., Ławkowicz W.: Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych. P.W.N. Warszawa, 1962 r.
  2. Brodan V., Kuhn E., Brodanová M., Válek J.: Čas. Lek. Čes., **107**, 1212—1215, 1968.
  3. Czermiński J., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A.: Metody statystyczne w doświadczeniach chemicznych. P.W.N. Warszawa 1970.
  4. Kutzim H., Wellner U.: rozdział w: Ergebnisse der klinischen Nuklearmedizin. Diagnostik, Therapie, Forschung. Wyd. pod redakcją W. Horst i H.W. Pabst. F.K. Schattauer Verl., Stuttgart—New York 1971, s. 516—529.
  5. Kutzim H., Wellner U.: [w:] Nuklearmedizin. Radionuklide in der Hämatologie. Gegenwärtiger Stand der Therapie mit Radionukliden. Wyd. pod red. H. W. Pabst. F. K. Schattauer Verl.; Stuttgart—New York 1973, s. 97—100.
  6. Laurell C. B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **5**, 118—121, 1953.
  7. Lockner D.: Brit. J. Haemat. **12**, 646—656, 1966.
  8. Lynch S. R., Simon M., Bothwell T. H., Charlton R. W.: Clin. Sci., Mol. Med., **45**, 331—336, 1973.
  9. Najean Y., Dresch C., Ardaillou N., Bernard J.: Amer. J. Physiol. **213**, 533—546, 1967.
  10. Paterson J. C. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), **96**, 97—100, 1957.
  11. Pollycove M.: rozdział w: Iron Metabolism. An International Symposium sponsored by Ciba, Aix-En-Provence. Springer [erl., Berlin—Göttingen—Heidelberg 1964, s. 148—170.
  12. Pollycove M., Maqsood M.: Nature, **194**, 152—154, 1962.
  13. Pollycove M., Mortimer R.: J. Clin. Invest., **40**, 753—782, 1961.
  14. Schäfer K. H.: rozdział w: Iron Metabolism. An International Symposium sponsored by Ciba, Aix-En-Provence. Springer Verl., Berlin—Göttingen—Heidelberg 1964, s. 280—288.
  15. Tarkowska A.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D, **31**, 11—15, 1976.
  16. Vacek A., Rotkovská D., Raková A.: Rev. Europ. Etud. Clin. Biol **16**, 158—161, 1971.
- Otrzymano 13 II 1975.

## РЕЗЮМЕ

В хвостовую вену самцов крыс породы Wistar весом 231—296 г вводили 1  $\mu\text{Ci}$  цитрата  $^{59}\text{Fe}$  в изотоническом, стерильном и апирогенном растворах объемом 0,5 мл. Спустя 12 часов животных убивали, а потом определяли содержание радиоактивного железа в красных кровяных тельцах, обеих бедренных костях, в печени, селезенке и почках.

14 крысам  $^{59}\text{Fe}$  инкубировали утром (с 7 до 8 часов), а материал для исследований брали вечером (с 19 до 20 часов). 15 крысам инъекцию  $^{59}\text{Fe}$  делали вечером (с 19 до 20 часов), а материал для исследований брали утром (с 7 до 8 часов).

Авторы пришли к выводу, что инкорпорация радиоактивного железа в красные кровяные тельца была такая же, как в течение 12 часов ночи, так и в течение 12 часов дня.

Зато отложение  $^{59}\text{Fe}$  в костном мозге, печени, селезенке и почках оказалось значительно большим в течение дня, чем в течение ночи. Повышенный переход радиоактивного железа в вышеназванные органы происходил в течение такого же периода времени, в течение которого наступило наблюдаемое в предыдущей работе понижение уровня этого элемента в крови.

Авторы считают, что количественные изменения железа, покидающего плазму крови, играют существенную роль в механизме ритмических колебаний сидеремии, происходящих в течение суток.

## SUMMARY

Investigations were performed on normal male Wistar rats weighing 231 g. — 296 g. 12 hours after an intravenous injection of 1  $\mu\text{Ci}$   $^{59}\text{Fe}$  in 0,5 ml isotonic, sterile, and apyrogenic solution the animals were killed and the radioiron content in the erythrocytes, femoral bone marrow, liver, spleen and kidneys was estimated. In 14 rats the injection was given in the morning (between 7.00 and 8.00 am) and the measurements were performed in the evening (between 7.00 and 8.00 pm). In 15 rats  $^{59}\text{Fe}$  was injected in the evening and the measurements were done in the morning. The  $^{59}\text{Fe}$  incorporation of red blood cells was similar during the day and during the night. The accumulation of radioiron in the femoral bone marrow, liver, spleen and kidneys on the other hand was much greater during the day than in the night. That means, that the increased flow of  $^{59}\text{Fe}$  to those organs occurred at the same time of day in which a decrease in the serum iron level was observed. It was suggested that the diurnal variations of serum iron level are secondary to the changes in the outflow of this element from plasma.

