

## ИНТЕРАКЦИЈЕ БИОЕЛЕМЕНАТА ПРИ ПОВЕЋАНОМ УНОСУ БАКРА

Витошевић Б.<sup>1</sup>, Јаковљевић В.<sup>2</sup>, Павловић А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Катедра за медицинске предмете, Факултет за спорт и физичко васпитање, Универзитет у Приштини

<sup>2</sup>Институт за физиологију, Медицински факултет, Крагујевац

<sup>3</sup>Клиника за хирургију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

## THE INTERACTIONS OF BIOELEMENTS WITH INCREASED INTAKE OF COPPER

Витошевић Б.<sup>1</sup>, Јаковљевић В.<sup>2</sup>, Павловић А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of medical subjects, Faculty for sport and physical education, University of Priština

<sup>2</sup>Institute of physiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>3</sup>Clinic of surgery, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

### SUMMARY

Copper is an essential element, a constituent of all living cells and an integral component of many enzymes. The increase in pollution of the environment, and various metabolic diseases, imbalances biological processes and homeostatic regulated content of bioelements in the body. For the purpose of determining changes in the contents of bioelements with increased intake of copper, the paper followed by interaction before and after ingestion of copper. The results showed that copper in excess causes disruption of physiological interactions of bioelements in tissues and significantly increases the content of iron and magnesium. The nature and relationships of these interactions are important, because in terms of exposure to metals, there are changes in their mutual relations, with some of these antagonistic relationships may be utilized for further study in order to protect them from toxicity.

**Key words:** copper; interactions; bioelements; toxicity

### САЖЕТАК

Бакар је есенцијалан елемент, конституент свих живих ћелија и интегрална компонента многих ензима. Пораст загађења спољашње средине, као и разни метаболички поремећаји, нарушавају равнотежу биолошких процеса и хомеостатски регулисан садржај биоелемената у организму. У циљу одређивања промена у садржају биоелемената при повећаном уносу бакра, у раду су праћене интеракције пре и после уношења бакра. Резултати су показали да бакар у вишку изазива ремећење физиолошких интеракција биоелемената у ткиву и значајно повећава садржај гвожђа и магнезијума. Природа и односи ових интеракција су важни, јер у условима експозиције вишку неког од метала, долази до промена у њиховим међусобним односима, при чему нека од тих антагонистичких веза може бити искоришћена за даља испитивања у циљу заштите од токсичности.

**Кључне речи:** бакар; интеракција; биоелементи; токсичност

### УВОД

Бакар је есенцијалан елемент за све форме живота, као и конституент свих живих ћелија. Најважнији металоензими код људи код којих је бакар интегрална компонента су : цитохром-*c*-оксидаза, супероксид дигмутаза, аминоксидазе, диаминоксидазе, тирозиназе, уриказе и допамин-хидроксилазе. Бакар је неопходан у синтези хемоглобина, за развој и одржавање скелетних структура, односно колагена и еластина у костима и везивном ткиву, помаже одржавању мијелина око нервних влакана кроз синтезу фосфолипида, укључен је у метаболизам гвожђа и има улогу у важним функцијама имуно-система (1,2).

С обзиром на неопходност овог елемента, веома је важно одржавати баланс између његове есенцијалности и могућности да постане токсичан - а то је хомеостаза. Овај однос између уноса и потребе изражен је

физиолошким факторима за одржавање хомеостазе и спољашњим факторима који су у функцији доступности бакра.

Интеракције са другим металима су важне због одржавања метаболичких функција и део су нормалне нутритивне улоге бакра у организму. Доказано је да је дишења бакра могу да модификују фармакокинетику и токсичност других метала и хемијских супстанци.

Бројне студије указују да су бакар и цинк у позитивној корелацији и при повећаном уносу цинка, садржај бакра у ткиву се смањује (3,4,5). Редукција у супероксид-дигмутази у еритроцитима, индикативна код дефицита бакра, нађена је код људи који су узимали храну којој је додаван цинк (6). Тачан механизам њихове интеракције још није познат. Међутим, уношење вишка цинка доводи до индукције синтезе металотионеина у ин-

тестинуму и металотионеин има већи капацитет за везивање за Cu него за Zn (7). Дефицит, као и суфицит једног од ових елемената, доводе до бројних биохемијских и физиолошких промена и могу имплицирати неке хроничне болести. На пример, низак унос бакра у односу на цинк, рефлектован високим Zn: Cu односом, може бити импликација за коронарне болести (8). Суплементација цинком је ефективан третман код високог нивоа Cu у ткивима особа оболелих од Wilsonove болести (9).

Бакар и гвожђе су у интеракцији од молекуларног нивоа, па све до нивоа организма у целини (10,11). Гвожђе може заменити бакар у овотрансферинима, групи гвожђе-везаних протеина у беланцу јајета (12). Веза између гвожђа и бакра у анемији проузрокованој оловом, још није разјашњена. Хематопоеза је смањена код животиња са ниским садржајем бакра, а излагање олову, смањује је још више (13,14). Олово инхибира активност ферохелатазе, ензима који је потребан да инкорпорише гвожђе у молекулу хемоглобина. Ова инхибиција може бити прекинута додавањем бакра исхрани (15).

Неколико других дивалентних катјона компетитирају са баком у интестиналној апсорпцији, на пример кадмијум, гвожђе, калај, који доводе до смањене апсорпције бакра (16). У литератури се наводи интеракција бакра и мангана у односу на активност супероксид димутазае, као и податак да манган смањује формирање метхемоглобина и делимично инхибира баком насталу липидну пероксидацију (17).

Тиомолибдати имају способност редукције нивоа бакра у ткивима животиња и људи (18), при чему стварају солубилан комплекс са бакар-металотионеином, који се екскретује, а могу се комплексовати са нецерулоплазмином бакра у плазми и спречити његову целуларну апсорпцију (19).

Истраживана је и могућа интеракција између бакра и селена. Суплементација селена код људи показала је слабу, али не и значајну тенденцију смањења садржаја Zn, Cu, Fe и Pb у крви и урину, и у нивоу бакра у плазми жена које узимају оралне контрацептиве (20, 21, 22).

Очигледно је да смањен или повећан ниво неких биоелемената може да изазове поремећаје у апсорпцији и искоришћењу других, а у интеракцијама са тешким металима долази до појаве антагонизма на нивоу апсорпције.

## ЦИЉ РАДА

Повећано антропогено деловање на животну средину, све већа употреба пестицида и различите врсте индустријских емисија, угрожавају организам људи и животиња. За многе ксенобиотике још нису сасвим познати нежељени ефекти, а биолошки мониторинг, дефинисан као праћење биохемијских, морфолошких, физиолошких и патолошких промена услед дејства различитих хемијских супстанци на организам, може да пружи велике могућности истраживања токсичности. Токсични ефекти бакра могу се испољити и при ендогеним интоксикацијама код којих је повећана количина бакра у организму резултат метаболичких поремећаја (Wilson-

ova болест, примарна билијарна цироза, интрахепатална и екстрахепатална холестаза, индијска дечја цироза). Циљ нашег истраживања био је одређивање интеракција између метала у ткиву јетре у условима интоксикације баком.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Испитивања су вршена на адултним псима (*Canis familiaris*), оба пола, телесне тежине од 14-20 kg. У раду су испоштовани сви законом прописани принципи рада са експерименталним животињама (23).

Пре почетка експеримента, животиње су гладовале 24h, док им је вода давана *ad libitum*. Интрамукуларно даван Бенседин (у дози од 10 mg/2ml), деловао је анксиолитички и омогућавао њихов даљи третман. Пре почетка експеримента животиња је анестезирана и.м. ињекцијом Кетамина (30 mg/kg телесне тежине) и Dormicumom (0,15-0,2 mg/kg). Хируршка препаарација артерије и вене феморалис омогућавала је давање потребних медикамената, а одржавали су се спором инфузијом 0,9% NaCl. За све ово време пас се налазио на спонтаном дисању уз очувани ларингеални и фарингеални рефлекс. Након тога извршена је ендотрахеална интубација, а анестезија се продубљивала и.в. давањем Кетамина (2mg/kg/t.m.), а мишићна релаксација изазивала Павулоном (0,1 mg/kg/t.m.). Након тога је пас преведен на механичку вентилацију по типу контролисаног дисања преко респиратора (Сиенс-Серво вентилатор). После 10-минутне хемодинамске стабилизације 0,9% NaCl у спорој инфузији, животињама је даван 10% водени раствор CuSO<sub>4</sub> у дози од 12,5 mg/kg/t.m., (доза је одређена на основу литературних података) подељен у неколико доза. Крв потребна за биохемијске параметре, узимана је између две дозе CuSO<sub>4</sub>, а узорци ткива на крају експеримента узимани су биопсијом. Садржај биоелемената у ткиву одређиван је спектрометријском методом (Спектрометар типа AI-122-Aurora Instruments, Vancouver, Canada) (24). Анализа ткива рађена је у Покрајинском Заводу за заштиту здравља у Косовској Митровици.

У обради резултата коришћени су следећи дескриптивни статистички параметри и статистички тестови: средња вредност, стандардна девијација, тестирање статистичке значајности. У анализи резултата коришћене су графичке статистичке методе. Критеријум за статистичку значајност био је  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

Администрација бакар-сулфата довела је до значајне промене у садржају биоелемената. Интеракције катјона одигравале су се на различитим местима и нивоима, па је концепт интрацелуларног механизма интеракције тешко применити, јер је то дејство често неспецифично и бројна су места испољавања њихове интеракције.

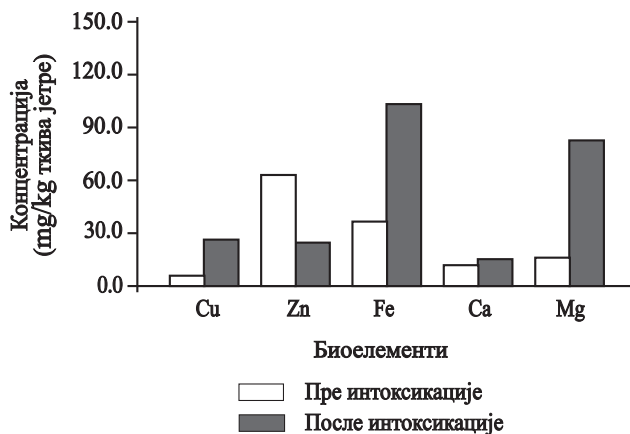
Кретања садржаја биоелемената у ткиву јетре након интоксикације бакар-сулфатом су приказана на графиканоу 1.

Садржај бакра у ткиву јетре после интоксикације је био значајно повећан ( $p < 0,001$ ), док је у исто вре-



ме садржај цинка показао значајан пад ( $p < 0,001$ ), што је показало да бакар и цинк међусобно интерреагују и налазе се у позитивној корелацији.

Садржај гвожђа се после интоксикације значајно повећао ( $p < 0,001$ ), као и садржај калцијума и магнезијума (статистички значајан пораст,  $p < 0,001$ ).



Графикон 1. Садржај биоелемената у ткиву јетре након интоксикације бакар-сулфатом.

## ДИСКУСИЈА

Уношење бакра у вишку је директно повезано са променама у метаболизму других елемената. Бакар, цинк и гвожђе су есенцијални елементи који показују међусобне интеракције и могуће инхибиције у транспорту и биодоступности (25, 26, 27). Компетиција бакра и цинка дешава се на месту апсорпције и на интрацелуларном нивоу (28). У процесу апсорпције долази до конкуренције за везујућа места у транспорту једињења. Следећи ниво интеракција дешава се на ћелијском нивоу, било да су синергистичке или антагонистичке, путем промоције или инхибиције реакција које укључују различите елементе. С обзиром да су биоелементи укључени у метаболичке функције као део ензимских система, њихова интеракција може бити комплементарна као резултат координације ћелијских функција или резултат интерференције или субституције у ензимској структури. Транспортни механизми за један елемент могу укључити једињења другог елемента или је у питању конкуренција за везујуће место од стране различитих елемената. С обзиром да су многе метаболичке функције секвендне или цикличне, интеракција елемената може бити присутна и на различитим местима циклуса. Интеракција се може десити и за време катаболичких фаза метаболизма, које воде ка екскрецији елемената и то у смислу стимулације и акцелерације екскреције или обрнуто, супресијом екскреције са абнормалним нагомиланом елемената.

Бакар и цинк су у конкуренцији за лиганде који омогућавају транспорт бакра кроз епител гастроинтестиналног тракта. При транспорту у крви, повећан садржај цинка, проузрокује пад у квантитативном садржају церулоплазмине и ово ремети транспорт бакра. Настало повећање бакра доводи до конкуренције са цин-

ком и у албуминским везама. Овакав однос бакра и цинка искоришћен је и у терапији Wilsonove болести, где орално администриран цинк може спречити даљу акумулацију бакра односно смањити његово нагомиланост.

Поремећаји у метаболизму бакра могу да утичу на метаболизам гвожђа, па вишак цинка делује антагонистички и на бакар и на гвожђе. Интеракција бакра и гвожђа на интестиналном нивоу, дешава се вероватно кроз конкуренцију за транспорт у ентероцитима преко DMT1 (откривено је да DMT1 регулише транспорт и  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ ), а ниво IREG1 протеина, који је повећан при већем уносу бакра (као резултат транскрипцијске регулације гена), води повећаном ефлуксу гвожђа из ћелија (29,30). Тако су Soubasis и сар. (31) показали повећан ниво серумског гвожђа и гвожђа у јетри паса у експериментално индукованим хепатопатијама, као и Schulltheiss и сар. (32), који су нашли висок ниво гвожђа и бакра, као и инфламаторне лезије у јетри паса са хепатоцелуларним оштећењима. Повећан ниво ових елемената може довести до индукције липидне пероксидације у ткиву. Протеини који садрже бакар, хефестин и церулоплазмин су са ферооксидазном активношћу и они катализују оксидацију гвожђа. Због тога је улога бакра, као конституента ових протеина, значајна за метаболизам гвожђа. Због тога промене у метаболизму бакра утичу и на биодоступност и транспорт гвожђа у ткивима.

Хипермагнезијемја је често удружена са хиперкалцемјом. Сматра се да су ткива која имају интензивну митохондријалну структуру и високу ензимску активност, посебно осетљива на промене у ћелијском снабдевању магнезијумом (33). Промене у метаболизму магнезијума могу да настану и преко ремећења нормалног тока респираторног ланца и могућих цитолитичких ефеката. Магнезијум активира значајан број ензима, има улогу у синтези протеина, а самим тим и у синтези ензима и сматра се битним регулатором ћелијског циклуса. Токсични ефекти бакра су најизраженији на ензимском нивоу, где бакар може да конкурише за исте положаје на ензиму за које се везују метални јони или може утицати на њихове кофакторе, али може изазвати промене и у регулацији транскрипције и транслације тих ензима.

## ЗАКЉУЧАК

Увођење бакра у вишку доводи до промена равнотеже биоелемената, а већина тих промена је антагонистичка. Највеће промене добијене су у значајном порасту гвожђа и магнезијума. Природа и односи ових интеракција су важни, јер у условима експозиције вишку неког од метала, долази до промена у њиховим међусобним односима, при чему нека од тих антагонистичких веза може бити искоришћена за даља испитивања у циљу заштите од токсичности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Olivares M and Uauy R.: Limits of metabolic tolerance to copper and biological basis for present recommendations and regulations. *Am J Clin Nutr* 1996;63: 846S-52S.
2. Olivares M and Uauy R.: Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr* 1996; vol.63; 791S-6S.

3. Chan S, Gerson B, Subramaniam S: The role of copper, molybdenum, selenium and zinc in nutrition and health. *Toxicology* 1998; 18(4); 673-685.
4. Yadrick Mk, Kenney MA, Winterfeldt EA: Iron, copper and zinc status. *Am J Clin Nutr* 1989;49; 145-150.
5. Bremner I, Beattie JH: Copper and zinc metabolism in health and disease, speciation and interactions. *Proc Nutr Soc* 1995;54; 489-499.
6. Lakatos B, Szentmihalyi K, Vinkler P, Balla J: The role of essential metal ions in the human organism and their oral supplementation to the human body in deficiency states. *Orv Het* 2004; 145(25); 1315-9.
7. Fischer PWF, Giroux A, Labbe MR: The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr* 1981;34; 1670-1675.
8. Abdel-Mageed AB, Oehme FW: A review on biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron, IV-Interactions. *Vet Hum Toxicol* 1990; 32; 456-458.
9. Lockhart Pj, Wilcox SA, Dahl HM, Mercer JF.: Cloning, mapping and expression analysis of the sheep Wilson disease gene homologue. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1491; 229-239.
10. Cockell KA, Wotherspoon AT, Belonje B, Fritz ME, Madere R, Hidiroglou N, Plouffe IJ, Ratnayake WM, Kubow S: Limited effects of combined dietary copper deficiency? Iron overload on oxidative stress parameters in rat liver and plasma. *J Nutr Biochem* 2005; 16(12); 750-6.
11. Matocha OJ, Karathanasis AD, Rakshit S, Wagner KM. Reduction of copper (II) by iron (II). *J Environ Qual* 2005; 34(5); 1539-46.
12. Sharp P: The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc Nutr. Soc* 2004; 63(4); 563-9.
13. Goyer RA: Toxic and essential metal interactions. *Annual Review of Nutrition* 1997; vol 17; 37-50.
14. Klauder DS, Petering HG: Protective value of dietary copper and iron against some toxic effects of lead in rats. *Environ Health Perspect* 1975; 12; 77=80.
15. Ren S, Mee RW, Frymier PD: Using factorial experiments to study the toxicity of metal mixtures. *Ecotoxicol Environ Sat* 2004; 59(1); 38-43.
16. Wapnir RA: Nutritional factors, proteins and the absorption of iron and cobalt. CRC Press, New York 1993; 99-129.
17. Kies C, Umoren J: Inhibitors of copper bioutilization. *Adv Exp Med Biol* 1989; 252; 81-92.
18. Geonratne SR, Howell JM, Gawthorne JM: Intravenous administration of thiomolybdate for the prevention and treatment of chronic copper poisoning. *Br J Nutr* 1981; 46(3); 457-67.
19. Brewer GJ: Practical recommendations and new therapies for Wilsons disease. *Drugs* 1995; 50; 240-249.
20. Aburto EM, Cribb A, Fuentalba IC et al.: The failure of selenium supplementation to prevent copper-induced liver damage in Fischer 344 rats. *Can J Vet Res* 2001 c; 65(2); 104-110.
21. Barceloux DG: Copper. *J Toxicol Clin* 1999; 37(2); 217-230.
22. Araya M, Olivares M, Pizzaro F et al.: Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(3); 646-650.
23. Zakon o zdravstvenoj zaštiti životinja (Sl.glasnik RS br. 37/91, 50/92, 33/93, 52/93, 53/95, 52/96 i 25/2000), čl. 37-40 Zakona o zaštiti životne sredine (Sl. glasnik RS br. 66/91, 83/92 i 53/95).
24. Atomska apsorpciona i emisija spektrometrija. Institut za nuklearne nauke- Vinča; Centar za permanentno obrazovanje 1981; Lola; Beograd.
25. Arredondo M, Nunez M: Iron and copper metabolism. *Mol Asp of Med* 2005; 26; 313-327.
26. Arredondo M, Munos P, Mura CV, Nunez M: DMT1 a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells. *Am J of Physiol* 2003; 284; C1525-C1530.
27. Tandy S, Williams M, Legget A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, Srai SK, Sharp P: Nramp expression in associated with ph-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal caco-2-cells. *J of Biol Chem* 2000; 275; 1023-1029.
28. Barone A, Ebesh O, Harper R and Wapnir R: Placental copper transport in rats: effects of zinc. *The Journal of Nutrition* 1998; 128(6); 1037-41.
29. Frazer DM, Anderson GJ: The orchestration of body iron intake. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30; 288-297.
30. Byrnes V, Barret S, Ryan E et al.: Increased duodenal DMT1 expression. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29; 251-260.
31. Soubasis N, Rallis T, Vlemmas J et al.: Serum and liver concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. *J of Gastroent and Hepat* 2006; 21; 599-603.
32. Schulltheiss PC, Bedwell CL, Hamar DW, Fettman MJ: Canine liver iron, copper and zinc concentrations and associated with histologic lesions. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14(5); 396-402.