Perlova reakcija – histokemijsko dokazivanje željeza u jetri

Kutle, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:824041

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PERLOVA REAKCIJA – HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE ŽELJEZA U JETRI
PERLS REACTION- HISTOCHEMISTRY OF IRON IN LIVER

SEMINARSKI RAD

Ivana Kutle
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković- Venturin

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ:

SADRŽAJ: 1
1.UVOD 2
2. BIOLOŠKO ŽELJEZO 4
2.1 Hemsko željezo 5
2.2 Nehemsko željezo 5
2.3 Klasična podjela željeza 6
2.3.1 Željezo slabo vezano na organske baze niske molekulske mase 6
2.3.2 Fe-S proteini 6
2.3.3 Transferini 6
2.3.4 Feritin i hemosiderin 7
3. NAKUPLJANJE ŽELJEZA U JETRI 7
4.PERLOVA REKACIJA 9
4.1 Povijesni razvoj Perlove reakcije 9
4.2 Kemija berlinskog modrila (Prussian blue) 10
4.3 Perfuzija Perlove i Turnbull metode 12
4.4 Pojačavanje osjetljivosti Perlove metode 12
5.1 Željezo sulfid metoda 15
5.2 Fluorescentna histokemija nehemskog željeza 15
5.3 Histokemijsko dokazivanje „redox„ aktivnog želejza 16
6. ZAKLJUČAK 17
LITERATURA 18
SAŽETAK 19
SUMMARY 20

1.UVOD

Željezo je prijelazni metal s dva svojstva bitna za svoju biološku ulogu :

- Sposobnost stvaranja stabilnih koordinativnih kompleksa
- Sposobnost postojanja u nekoliko oksidacijskih stanja

Dnevne potrebe za željezom iznose otprilike 10-15 mg i za muškarce i za žene. Ovaj esencijalni element je prisutan na aktivnim mjestima molekula odgovornih za bitne biološke funkcije poput prijenosa elektrona, sinteze DNA, prijenosa kisika i mnogih drugih.

Željezo sudjeluje u katalizi različitih oksidacijsko – redukcijskih reakcija upravo zbog svog kemijskog svojstva mijenjanja valencija. Ovo svojstvo omogućuje mu stvaranje citotoksičnog, visoko reaktivnog hidroksilnog radikala $OH^{\cdot}$ putem Fentonove reakcije ili preko Haber – Weissove reakcije u prisutnosti vodikova peroksida H_2O_2 ili kisika O_2.

Fentonova rekacija:

$$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}}$$

Haber –Weissova reakcija :

$$\mathbf{Fe^{3+} + O_2^{-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2}$$

$$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}}$$

$OH^{\cdot}$ radikal oksidira biološki važne makromolekule poput ugljikohidrata, proteina, DNA i membranskih lipida uzrokujući apoptozu i nekrozu stanica ili inicijaciju karcinogeneze. Zbog ovih činjenica lokalizacija željeza koje katalizira nastanak $OH^{\cdot}$ slobodnog radikala je jako bitna za praćenje različitih oštećenja tkiva.

Da bi se umanjila ovakava reaktivnost željeza organizmi su razvili dva mehanizma koja drže željezo u netoksičnom obliku :

- Transport željeza (transferin)
- Skladištenje željeza (feritin i hemosiderin)

Stanični sadržaj željeza je visoko kontroliran posttranskripcijskom regulacijom ekspresije transferinskih receptora i feritina. Unatoč toj kontroli postoje evidentni dokazi koji nas upućuju da željezom kataliziranо stvaranje $OH^{\cdot}$ radikala i peroksida uzrokuje različita

oštećenja poput multiple skleroze, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, hemokromatoze, Hallervorden – Spatz sindroma, Friedreichove ataksije i mnogih drugih, štoviše OH˙radikal se smatra rizičnim faktorom za razvoj karcinoma.

U različitim patološkim istraživanjima vizualizacija željeza u tkivima daje nam uvid u njegovo sudjelovanje u razvoju raznih tkivnih oštećenja. Jedna od ranijih metoda za histokemijsko dokazivanje željeza bila je Tiermann – Schmertzer metoda pomoću koje je okarakteriziran već spomenuti Hallervorden – Spatz sindrom. Primjećena je velika količina odloženog željeza u bazalnim ganglijima, degeneracija živčanih stanica te povećan broj glija stanica. Nedavno je otkriveno i oštećenje mitohondrija uzrokovano akumulacijom nehemskog željeza čija je posljedica razvoj Friedreichove ataksije. Većina pacijenata s ovim poremećajem imaju mutacije u jezgrinim genima koji kodiraju mitohondrijski frataxin - protein regulator metabolizma željeza u mitohondriju.

Sama povijest histokemije nehemskog željeza je jako duga. Nakupine željeza u stanicama srčanog mišića oboljelih od Friedreichove ataksije su dokazane upravo Perlovom reakcijom 1976. godine. Perlova reakcija je bila prva u ovom području još davne 1867. godine. Perls je tada koristio kalijev ferocijanid i klorovodičnu kiselinu da bi vizualizirao željezo u tkivu.

Kasnije se koristio i amonijev sulfid , a danas je sve više i više kombinacija starih i novih tehnika u dokazivanju željeza o čemu će biti riječi u daljnjem tesktu [1].

2. BIOLOŠKO ŽELJEZO

Željezo je esencijalni kemijski element u organizmima. Tijelo muškarca od 70 kg sadrži oko 4 g željeza, od čega 65 % otpada na hemoglobin, a oko 17-18 % je pohranjeno u jetri, slezeni i koštanoj srži uglavnom kao feritin i hemosiderin. Željezo u tim molekulama je dostupno za stvaranje svježeg hemoglobina, a ostatak se nalazi u mioglobinu, citokromima, različitim enzimima.

Tablica 1. Raspodjela željeza u tijelu zdravog muškarca *(* Farmakologija, *H.P. Rang* i sur. , 2006. , str.331)

Protein	**Tkivo**	**Sadržaj željeza (mg)**
HEMOGLOBIN	ERITROCITI	2600
MIOGLOBIN	MIŠIĆ	400
ENZIMI(CITOKROMI, KATALAZA, ...)	JETRA I DRUGA TKIVA	25
TRANSFERIN	PLAZMA I IZVANSTANIČNA TEKUĆINA	8
FERITIN I HEMOSIDERIN	JETRA SLEZENA KOŠTANA SRŽ	410 48 300

Dnevne potrebe za željezom su od 10 – 15 mg , dok je kod trudnica spomenuta doza dva do deset puta viša. Najveća količina pohranjenog nehemskog željeza nalazi se u jetri kao što je i vidljivo iz tablice 1., te ovisno o njegovoj količini u organizmu može prijeći u plazmu i prenijeti se do drugih stanica ili može ostati uskladišteno u obliku feritina ukoliko su zalihe u organizmu visoke.

Željezo u tijelu možemo kategorizirati na hemsko i nehemsko željezo ovisno o njegovu metabolizmu i kemijskoj strukturi [2].

2.1 Hemsko željezo

Hemsko željezo bi bilo ono koje stvara kompleks s protoporfirinom i čini hem - prostetičku skupinu hemoglobina, mioglobina, citokroma. Hem se stvara u mitohondriju pomoću ferokelataze iz Fe^{2+} i protoporfirina. Prilikom razgradnje proteina s hemom, proteinsku polovicu razgrade lizosomski enzimi, a željezo se otpušta iz hema oksidativnim cijepanjem protoporfirinskog prstena pomoću hemoksigenaza u mitohondriju.

2.2 Nehemsko željezo

U nehemsko željezo se ubrajaju različite vrste kompleksa željeza:

- Nehemsko željezo snažno vezano za proteine transporta željeza
- Nehemsko željezo slabo vezano za različite organske baze niske molekulske mase
- Proteini s nehemskim željezom, u kojima željezo pridonosi njihovoj strukturi , npr. Fe-S proteini
- Željezo za skladištenje (feritin i hemosiderin)

Nehemsko željezo u tkivima postoji u fero (Fe^{2+}) i feri (Fe^{3+}) obliku .U vodenoj otopini i Fe^{2+} i Fe^{3+} grade heksamerne komplekse s vodom. Njihova topljivost u vodenoj otopini ovisi o pH vrijednosti otopine. Pri fiziološkoj pH Fe^{3+} je gotovo potpuno istaložen u obliku $Fe(OH)_3$, dok je topljivost Fe^{2+} znatno veća i njegova maksimalna koncentracija iznosi oko 10^{-1}M. Ova činjenica je vrlo značajna budući da Fe^{2+} može katalizirati Fentonovu reakciju pri fiziološkoj vrijednosti pH [1].

Reduktivni uvijeti u stanici te prisutnost reagensa poput askorbinske kiseline, tiola i superoksida mogu reducirati Fe (III) u Fe (II) . Da bi se izbjegao rizik stvaranja toksičnog $OH^{\cdot}$ radikala , Fe^{3+} je čvrsto vezan za transportne proteine željeza – transferine, također se i pohranjuje u feritin koji može pohraniti 4 500 atoma željeza u obliku ferihidirita. Željezo se pohranjuje i u hemosiderinu fagolizosoma u obliku sličnom ferihidritima feritina.

Željezo iz nehemskog kompleksa se otpušta u endosome i lizosome unutar kojih je pH od 5.5 – 6.0 . Lizosomalne i endosomalne ferireduktaze reduciraju Fe^{3+} do Fe^{2+} . Prisutnost te male zalihe Fe^{2+} u endosomima / lizosomima je dokazana Turnbull metodom ukazujući na redukciju feri iona u tim organelima [3].

2.3 Klasična podjela željeza

Biološko željezo klasično je podijeljeno na tzv. „maskirano“ i „ nemaskirano“ ovisno o mogućnosti histokemijskog dokazivanja njegove prisutnosti u tkivima. U „maskirano“ se ubraja željezo gusto vezano na nepoznate komponente te hemsko željezo. Da bi se dokazala njegova prisutnost tkiva se tretiraju jakim oksidansima koja oslobađaju željezove ione iz tih komponenti, dok se „nemaskiranim“ smatra nehemsko slabo vezano željezo koje se oslobađa u kiselim otopinama. Stoga histokemija nehemskog željeza uključuje niske pH vrijednosti te korištenje različitih kiselina kao reagensa, npr. octene, klorovodične i trikloroctene [3].

Postoje različiti mehanizmi otpuštanja željezovih iona iz pojedinih tipova nehemskog željeza .

2.3.1 Željezo slabo vezano na organske baze niske molekulske mase

U ovom tipu nehemsko željezo je vezano ionskom vezom za organske baze poput nukleotida, membranskih fosfolipida, citrata, karbonata ili askorbata i često se naziva labilno ili kelatirajuće željezo te može biti u fero i u feri obliku. Prisutnost feri iona željeza dokazuje se ATP ovisnim unosom željeza iz Fe (III) citrata i Fe (III) ATP u jezgrama stanica jetre, dok je prisutnost fero iona dokazana korištenjem fluorescentnih prijelaznih metala kao indikatora. Međutim, količina nehemskom željeza vezanog na ovakav način je premala da bi se mogla vizualizirati histokemijskim metodama koje ovise o stvaranju netopljivih željezovih percipitata [3].

2.3.2 Fe-S proteini

Željezovi atomi vezani su kovalentnim vezama na sumpor čineći klastere. Da bi došlo do otpuštanja željeza iz ovih kompleksa potrebna je denaturacija proteina,te se npr. za otpuštanje željeza iz feredoksina koristi diamnino benzoična kiselina , HCl i H_2O_2 , a također se može koristiti i 10%-tni metanol i trikloroctena kiselina pri vrlo niskoj vrijednosti pH (<1) [3] .

2.3.3 Transferini

Transferini su proteini koji prenose dva Fe^{3+} iona po molekuli koja su za nijh čvrsto vezana. U stanicama se Fe^{3+} otpušta sa transferina u endosomima, a u *in vitro* uvjetima je otpušten u 2%-tnoj octenoj kiselini , reduciran do Fe^{2+} pomoću tioglikolatne kiseline te vizualiziran indikatorima fero iona [3].

2.3.4 Feritin i hemosiderin

Molekule feritina koje sadrže željezove ione su degradirane protezama u lizosomima i pri tom se oslobađa Fe^{3+} ion. Mehanizam otpuštanja željezovih iona iz hemosiderina još nije poznat, ali se smatra da je sličan kao i kod feritina budući da je hemosiderin produkt proteolize feritina u fagolizosomima. U uvjetima *in vitro* željezo se ne otpušta direktno iz ova dva spomenuta proteinska kompleksa nego oslobađanje iona omogućuje kisela denaturacija proteina i zamjena željezovih iona protonima [3] :

$$\mathbf{5\ Fe_2O_3 \times 9\ H_2O\ (ferihidrit) + 30\ H^+ \longrightarrow 10\ Fe^{3+} + 24\ H_2O}$$

$$\mathbf{Fe_2\ FeO_4\ (magnetit)\ + 8H^+ \longrightarrow 2\ Fe^{3+} + Fe^{2+}\ + 4\ H_2O}$$

$$\mathbf{Fe_2O_3\ (hematit) + 6H^+ \longrightarrow 2Fe^{3+} + 3H_2O}$$

3. NAKUPLJANJE ŽELJEZA U JETRI



SLIKA 1 . Zdrava jetra



SLIKA 2 . Oštećena jetra (prekomjerno nakupljanje željeza)

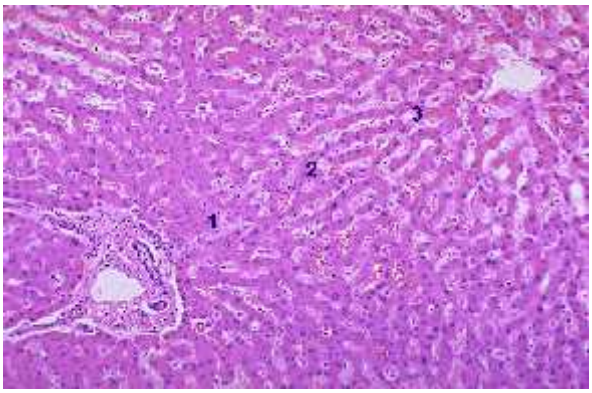
(http://www.wikipedia.org)

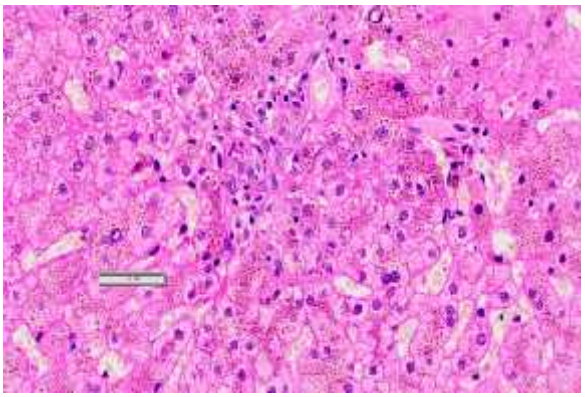
Jetra je najveća probavna žlijezda u ljudskom organizmu i uz žučne vodove i žučnjak čini jedinstveni sustav bitan za održavanje normalnih životnih uvjeta (Slika 1.). Ovaj organ ima više funkcija : sinteza raznih proteina, ekskrecija mnogih metabolita, detoksikacija, te uloga u metabolizmu proteina, masti, ugljikohidrata kao i regulacija količine željeza u ogranizmu.

Poremećajem nekih od tih funkcija dolazi do razvoja različitih bolesti jetre. Najčešća bolest jetre povezana s poremećajem u metabolizmu željeza danas je hemokromatoza (Slika 2.) [4].

Hemokromatoza je autosomno recesivna nasljedna bolest pri kojoj dolazi do nakupljanja željeza u tijelu. Do nje dovodi mutacija gena HFE na kromosomu 6 koja uzrokuje povećanje apsorpcije željeza iz hrane u crijevnoj sluznici, te se željezo prekomjerno nakuplja u unutrašnjim organima poput gušterače, srca, endokrinih žlijezda , a najčešće jetre. Sama bolest posljedica je izravnog toksičnog djelovanja željeza na tkiva što je spomenuto u uvodu. Zanimljivo je da je bolest kod muškaraca učestalija nego kod žena u omjeru 6 : 1 [1].

Glavna morfološka značajka hemokromatoze u jetri je nakupljanje željeza u obliku hemosiderina. Hemosiderin se najprije nakuplja u citoplazmi jetrenih stanica, a kasnije se može naći i u Kupfferovim stanicama, epitelu žučnih kanalića te čak i u vezivu (Slika 4). Tijekom godina dolazi do razvoja ciroze jetre pri kojoj taj organ dobiva nodularnu površinu, crvenkasto – smeđu boju te je povećan [4-5].

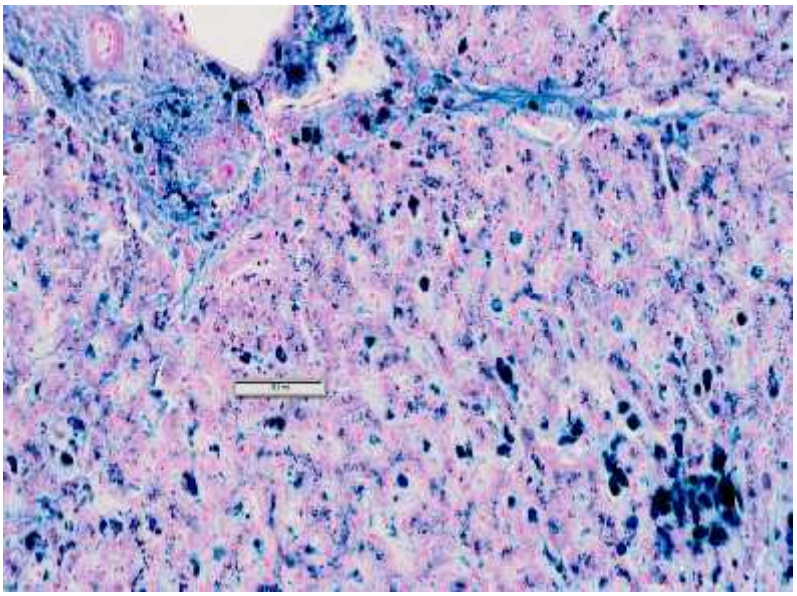




SLIKA 3. Tkivo zdrave jetre (H&E) *SLIKA 4. Hemokromatoza jetre*

(http://www.perpetuum-lab.com.hr)

Da bi se dijagnosticirala hemokromatoza jetre, kao i mnoge druge jetrene bolesti koriste se razni laboratorijski funkcionalni jetreni testovi i biopsija jetre. Danas je jedna od najčešćih metoda za dokazivanje hemokromatoze mikroskopsko dokazivanje nakupljanja željeza pomoću berlinskog modrila odnosno tzv. **Perlove reakcije** (Slika 5.).



SLIKA 5. Hemokromatoza jetre (berlinsko modrilo)

(http://www.perpetuum-lab.com.hr)

4.PERLOVA REKACIJA

Perlova reakcija je vrlo stara metoda, ali se i danas koristi za vizualizaciju nehemskog željeza u laboratorijskom radu. Glavne prednosti su joj specifičnost za željezo, jednostavna je za izvesti te je uz to i jeftina. Metoda se zasniva na stvaranju netopivog berlinskog modrila u sekcijama tkiva tretiranih kiselim ferocijanidom.

4.1 Povijesni razvoj Perlove reakcije

Perls je 1867. godine uveo berlinsko modrilo u vizualizciju željeza prilikom autopsije tkiva i organa. Metodu je još ranije opisao Grohe, međutim ni jedan od autora nije precizirao koncentracije kalijeva ferocijanida i HCl-a koje su koristili u svojim radovima. Obojica su naprije tretirali uzorke kalijevim ferocijanidom i potom su dodali malu količinu HCl-a. Takva procedura je bila pogodna jer se željezo otpušta iz tkiva u kiselim uvjetima i izgubi ukoliko nije prisutan ferocijanidni ion. Ta činjenica je vrlo značajna budući da je disocijacija iona iz soli opisana tek 20 godina kasnije (1887.g).

U daljnim radovima mnogi istraživači su pripremali Perlovu smjesu s različitim udjelima sastojaka. Mnogi od njih su korisitili pogrešne koncentracije i temperature , npr. Lillie koji je

koristio 2%-tnu octenu kiselinu i 5%-tni kalijev ferocijanid pri temperaturi od 80 ˚C- zagrijavanje otopine je bilo potpuno nepotrebno. Najpopularnija i najtočnija sve do danas bila je Lisonova smjesa iz 1936. godine. Lison je u vrlo kiselim uvjetima (pH 0.6- 0.75) uzeo jednake volumene 2% -tnog ferocijanida i 2%-tne klorovodične kiseline HCl što se pokazalo ispravnim i dalo najbolje rezultate.

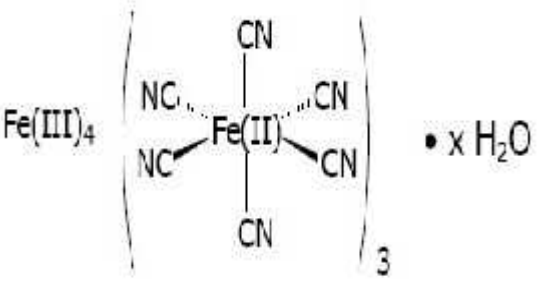
U reakciji nehemsko željezo (Fe (III)) vezano na organske baze, polarne glave membranskih lipida, proteine,nukleotide oslobađa se u kiselu otopinu, reagira s ferocijanidinim ionom i stvara berlinsko modrilo. Iako je opisano i topivo i netopivo berlinsko modrilo, ipak je dokazano da je svo nastalo berlinsko modrilo netopivo.

Reakcija nastanka berlinskog modrila je vrlo jednostavana , događa se samo između aniona i kationa te ukazuje na činjenicu da je reakcija moguća samo ukoliko su Fe^{3+} ioni oslobođeni u otopinu i dostupni za ferocijanidni ion. Perlova metoda dakle dokazuje prisutnost nehemskog željeza samo ukoliko je ono u ionskom obliku [3].

4 Fe^{3+} + 3 $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ ⟶ $Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$ × 14-16 H_2O → BERLINSKO MODRILO

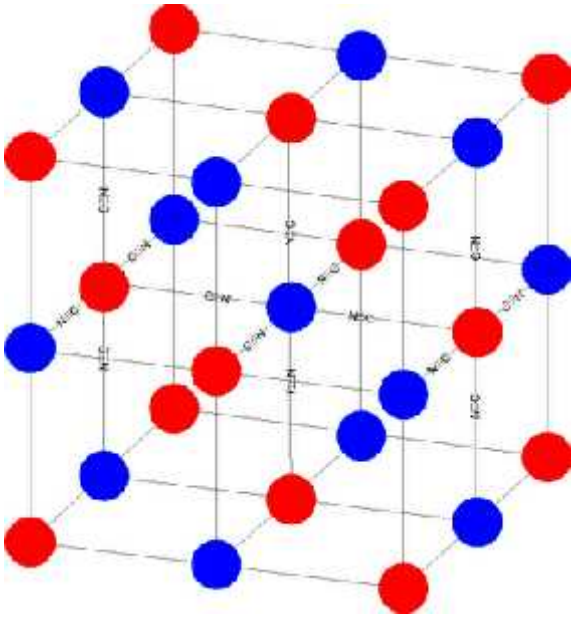
Fe^{3+} + $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ + K^+ ⟶ $KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$ → tzv. Topivo BERLINSKO MODRILO

4.2 Kemija berlinskog modrila (Prussian blue)



Berlinsko modrilo je željezo (III) heksacijanoferat (II) i prva je umjetno stvorena boja još davne 1704. godine u Berlinu. Budući da je bila dosta jeftina, širom Europe koristili su je mnogi umjetnici, čak i poznati Monet, Van Gogh i Picasso.

Berlinsko modrilo je tamno plavi kristalni talog. Kristalna rešetka je poput mreže Fe (III) vezanih na dušikov atom cijanida i Fe (II) vezanih na ugljikov atom cijanida → Fe(III) ═ NC – Fe (II) (Slika 6.) [3, 6-7].



SLIKA 6. Kristalna rešetka berlinskog modrila

(http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic50177a008)

Između željezovih iona dolazi do prijenosa naboja preko cijanidnih mostova što uzrokuje apsorpciju crvene svjetlosti vidljivog dijela spektra dajući time intezivno plavo obojenje. Elektronskim mikroskopom mogu se vidjeti pojedinačni ili agregati kristala berlinskog modrila.

Topivo berlinsko modrilo nije uistinu topivo, međutim postoje mali dijelovi feri ferocijanida raspršeni u vodi poput koloidnih kapljica u kojima je kalijev ion u šupljini svake jedinice berlinskg modrila. Blokirajući šupljinu nekim drugim kationima poput Li^+ , Na^+ , Mg^{2+}, H^+ i Ca^{2+} može se spriječiti stvaranje „topivog“ i povećati taloženje netopivog berlinskog modrila.

Pri pH vrijednostima većim od 7 berlinsko modrilo je nestabilno jer hidroksilni ion razlaže ovaj spoj na feri oksid, feri hidroksid i fericijanid ione, te se formira od nastalih spojeva smeđi talog. Utjecaj hidroksilnog iona moguće je spriječiti dodavanjem nikla čime se dobije modrozeleni talog.

Ferocijanidni ion i fero ion stvaraju bijeli talog ili tzv. Everittovu sol koja polako oksidira u zraku i vodenoj otopini stvarajući berlinsko modrilo. Ta reakcija dokazuje da su u Perlovu metodu uključeni i fero ioni željeza i da nije karakteristična samo za feri ione kako se ranije mislilo [3].

Reakcija :

Fe^{2+} + $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ ⟶ $2K^+$ + $\underline{K_2Fe^{II}[Fe^{II}(CN)_6]}$ → EVERITTOVA SOL

Ferocijanidni ion stvara i s drugim metalima netopive taloge, npr. s Cu^{2+} i s Zn^{2+} (bijeli i smeđi talog). Ovi talozi osim što se razlikuju po boji od berlinskog modrila, ne mogu ni katalizirati oksidativnu polimerizaciju DAB-e vodikovim peroksidom.

4.3 Perfuzija Perlove i Turnbull metode

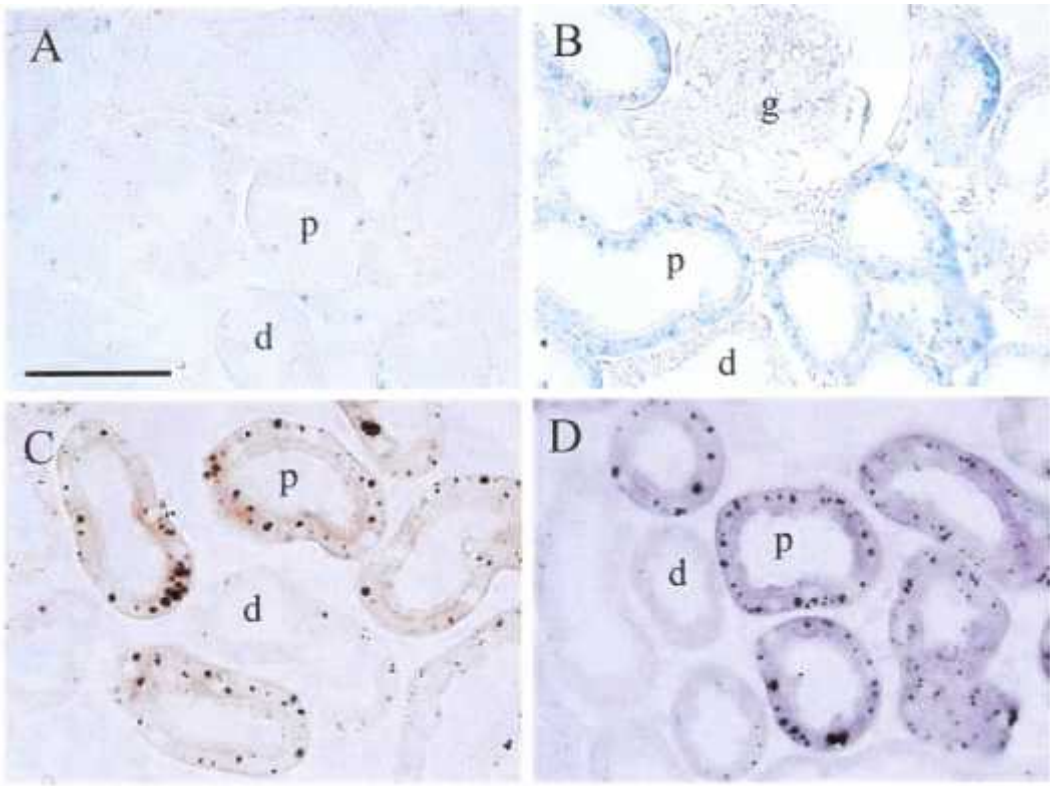
Vrlo slična Perlovoj metodi je i Turnbull metoda koja je specifična samo za Fe(II) ione. Zasniva se na istom principu, a spoj koji nastaje je Turnbull modrilo, vrlo slično berlinskom modrilu, ali s različitim koncentracijama komponenti koje ga čine.

Da bi se dobila što osjetljivija metoda za dokazivanje željeza u tkivima, ove dvije metode često se koriste istovremeno. Također se znatno osjetljivijom pokazala i perfuzija ovih metoda *in vivo* (Slika 7.).

Obje metode ovise o stvaranju netopivih i stabilnih Fe(III) ili Fe (II) komponenti *in vivo.* Mnoge su prednosti perfuzije ovih dvaju metoda. Spriječena je redoks promjena nehemskog željeza i nakon smrti kao i neizbježni gubitak labavo vezanog željeza i oksidacija fero željeza tijekom obrade tkiva. Druga značajna prednost je i vizualizacija željeza pri različitim pH vrijednostima, te je laka identifikacija tkiva i organa koji sadrže željezo zbog pojave plavih taloga [3, 8-9].

4.4 Pojačavanje osjetljivosti Perlove metode

Berlinsko modrilo i Turnbull modrilo imaju svojstvo primanja i davanja elektrona te mogu katalizirati oksidaciju odnosno redukciju H_2O_2 koji se razlaže na H_2O i O. Neki kromogeni poput 3,3–diaminobenzidina (DAB-e) i fenilhidrazin HCl-a mogu pojačati reakcije berlinskog i Turnbull modrila te se također koriste za detekciju redoks aktivnog željeza. Metoda pojačavanja Perlove reakcije ovisi o oksidativno-reduktivnoj razgradnji vodikova peroksida H_2O_2 berlinskim modrilom ujedno s oksidativnom polimerizacijom DAB-e (Slika 7. i Slika 8.). Dodavanjem $CoCl_2$ u otopinu DAB/H_2O_2 omogućena je vizualizacija nastalog DAB polimera. Produkt iz smeđe prelazi u crnu boju. Ovom reakcijom teško je odrediti količinu željeza, ali i najmanje koncentracije željeza su vidljive.



SLIKA 7. Histokemija nehemskog željeza svjetlosnim mikroskopom u bubregu štakora : A) Perlova metoda u uzorcima tkiva fiksiranih u formalinu, B) Perfuzija Perlove metode, C) Perlova metoda pojačana DAB-om , D) Perlova metoda + DAB/ $CoCl_2$

(Meguro R. i sur. , 2007.)

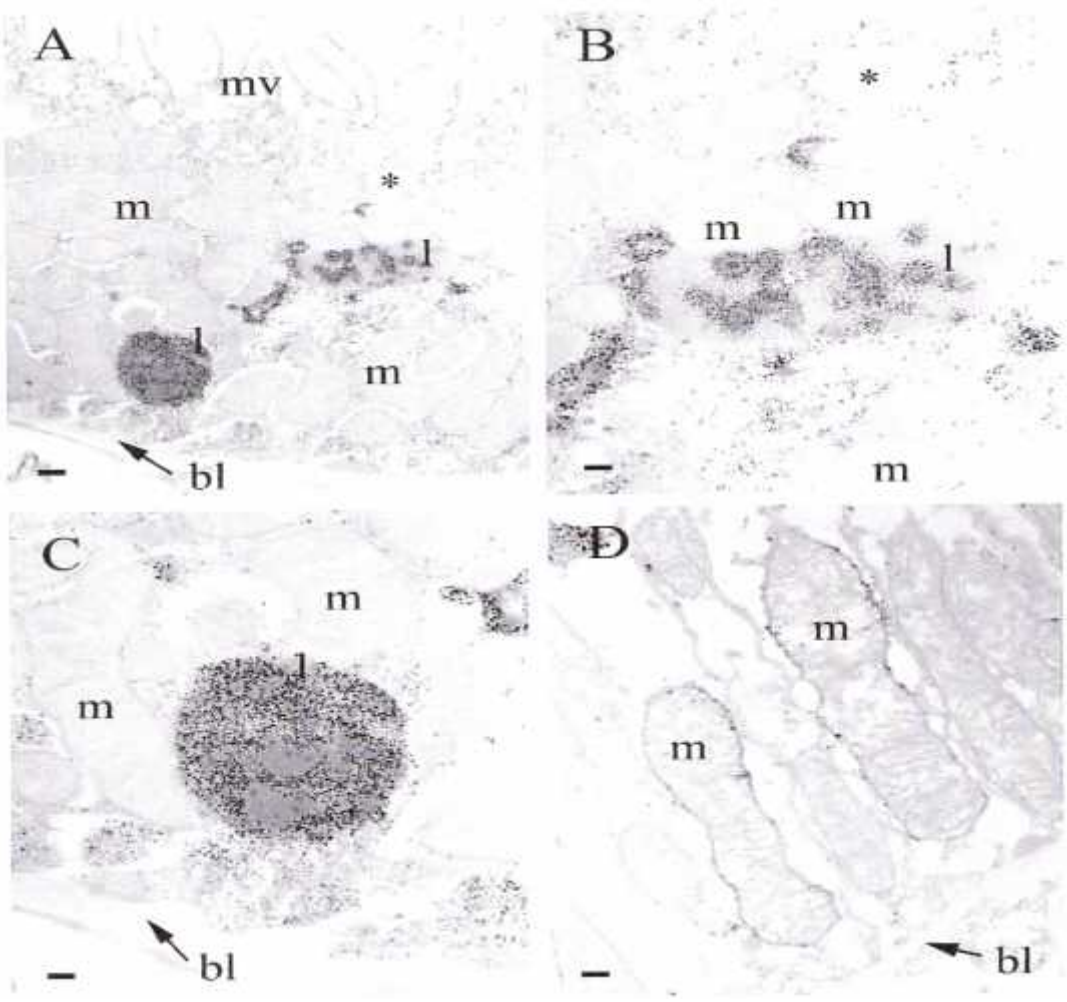
Pri proučavanju mitohondrija jetrenih stanica miša dokazano je da Perlova metoda pojačana s DAB/$CoCl_2$ (Slika 7.D) i Perlova-srebro-zlato-uranil-nitrat metoda (Slika 8.C) jasno vizualiziraju položaj katalitičkog željeza koje se može taložiti peroksidacijom staničnih makromolekula.

Moguća je intenzifikacija Perlove i Turnbull metode i nakon polimerizacije DAB-a što se često koristi za bolju vizualizaciju pri elektronskoj mikroskopiji (Slika 8.). PoliDAB su slabi reducirajući reagensi koji reduciraju feri fericijanid do fero fericijanida. Metali poput Au^{3+} i Ag^{+} se mogu koristiti umjesto feri fericijanida za postDAB intenzifikaciju posredovanu metalima (Slika 8.C). Često se koristi i OsO_4, ali je pritom vrlo teško razlikovati male količine pDAB iz pozadine koju stvara osmonijev tetroksid. Najčešće se ipak primjenjuju soli srebra zbog njihovog svojstva da jedan istaloženi metal srebra potiče daljnju redukciju srebrovih iona i znatno ubrzava reakciju. U ovoj metodi ioni srebra potječu od ionskog kompleksa srebro-metenamin, reducirani su polimerom DAB, talože se na površini i

supstituiraju ionima zlata Ag^{3+}. Reducirajuće skupine u tkivu mogu reducirati srebrove one i stvoriti time pozadinsko obojenje, te se zbog toga tkiva tretiraju reducirajućim reagensima prije intenzifikacije srebrom. Poznata je još jedna metoda koja uključuje srebro, međutim u toj metodi ne dolazi do redukcije Ag^{+} iona berlinskim modrilom, nego do supstitucije Fe^{III} iz berlinskog modrila s ionima srebra [8].

$$\mathbf{Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3 + 12\,Ag^{+} \longrightarrow Ag_{12}[Fe^{II}(CN)_6]_3 + 4Fe^{3+}}$$

berlinsko modrilo **srebro ferocijanid**



SLIKA 8. Histokemija nehemskog željeza elektronskim mikroskopom u bubregu štakora : A) Perfuzija Perlove metode , B) Intenzifikacija DAB-om , C) Post-DAB intenzifikacija zajedno s metenamin-srebro /zlato supstitucijom D) Distalni kanalići - mali broj granula željeza vidljiv

(Meguro R. i sur. , 2007.)

5. OSTALE HISTOKEMIJSKE METODE ZA DOKAZIVANJE ŽELJEZA

5.1 Željezo sulfid metoda

Metoda je opisana još 1850-e godine, a 1986-e je uvedena i u mikroskopska histokemijska proučavanja željeza u tkivima. Zasniva se na sulfoniranju tkivnog željeza pomoću H_2S , $(NH_4)_2$ S ili Na_2S.

Sulfidna metoda nije specifična za željezo, ali stvara različite sulfidne metale poput ZnS i CuS koji se razlikuju po boji nastalog taloga (bijeli i crni talog). Najčešće se kao reagens koristi $(NH_4)_2S$ koji stvara dovoljno bazičnu otopinu za denaturaciju proteina i izdvajanje hema iz njih koji reagira sa S^{2-} ionima.

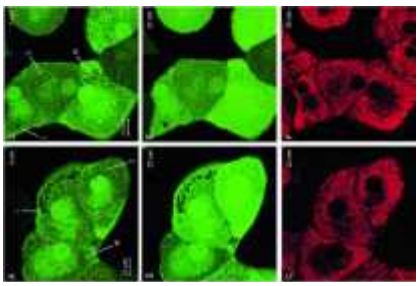
Reakcije :

$Fe(III) + S^{2-} + e^{-} \longrightarrow Fe(II)S$

$Fe^{2+} + S^{2-} \longrightarrow Fe(II)S$

5.2 Fluorescentna histokemija nehemskog željeza

Godine 2002. Petrat i suradnici su otkrili metodu koja može kvantificirati količinu kelatirajućeg željeza u izoliranim živim stanicama sisavaca. Metoda se zasniva na suzbijanju flourescencije indikatora metala (PG , SK, rodaina, kalceina, ...) te na njenom ponovnom uspostavljanju poznatim količinama različitih kelatora dvovalentnih metala . Količina fluorescencije mjeri se digitalnim fluorescentnim ili laserskim mikroskopom (Slika 9.).



Ovom metodom moguće je preko količine fluorescencije odrediti vrlo niske količine kelatirajućeg željeza u mijeloidnim stanicama (0.2 -1.5 µM) , mitohondriju (12.2 +/- 4.9µM)i, hepatocitama (9.8+/- 2.9µM) kao i u samoj jezgri hepatocita (6.6 +/ 2.9 µM)[3, 10].

SLIKA 9 . Dokazivanje nehemskog željeza u hepatocitama fluorescencijom

(Petrat F. i sur. , 2001.)

5.3 Histokemijsko dokazivanje „redox„ aktivnog željeza

Nehemsko željezo nazvano redox aktivno može katalizirati oksidacijsko – redukcijske reakcije u kojima reducira / oksidira vodikov preoksid.

$$Fe^{3+} + ½\ H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + O + H^+ \quad \textbf{OKSIDACIJA}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \quad \textbf{REDUKCIJA}$$

Reakcija se vizualizira dodavanjem nekih kromogena (DAB, fenilhidrazin- HCl) koji se pri tom oksidativno polimeriziraju. Prilikom prikazivanja Fe^{3+} iona unešenih injekcijom u sinusoidne stanice jetre štakora, ova metoda uz kromogen fenilhidrazin-HCl pokazala se znatno osjetljivijom od Perlove metode, ali samo za svjetlosnu mikroskopiju.

Za elektronsku mikroskopiju se kao kromogen koristi DAB, te je pomoću ove metode utvrđeno povećanje količine aktivnog željeza u lezijama mozga kod oboljelih od Alzheimerove bolesti i u crnoj tvari kod oboljelih od Parkinsonove bolesti, što je također potvrđeno i Perlovom metodom.

Opisana metoda ima znatnu prednost u vizualizaciji nehemskog željeza svjetlosnim i elektronskim mikroskopom u tkivima i organima u odnosu na druge metode.

U uporabi su bile i druge histokemijske metode poput Schmelzerove u kojoj je željezo vizualizirano tamnocrvenim obojenjem, ali se više ne koristi zbog velike toksičnosti tiocijanične kiseline kojom su se tretirala tkiva i Mallory-jeve metode koja koristi hematoksilin i kelatore fero iona te joj je glavni nedostatak sposobnost hematoksilina da oboji i druge tvari u tkivu [3, 8].

6. ZAKLJUČAK

Željezo je jedan od najvažnijih minerala potrebnih za normalan rast i razvoj stanica, tkiva i organizma. Također je jedan od esencijalnih elemenata i njegova funkcija je višestruka. Najviše željeza je uključeno u transport kisika u obliku hema, a ostatak je skladišten u različitim unutarnjim organima u obliku feritina i hemosiderina. Količina željeza u ogranizmu je od velike važnosti , iako ne postoji neki poseban mehanizam regulacije. Manjak ili višak ovog elementa dovodi do razvoja različitih bolesti poput anemija i različitih tkivnih oštećenja kod njegova prekomjernog nakupljanja, prvenstveno zbog velike sposobnosti željezovih iona da stvaraju visoko toksične radikale. Razne su bolesti današnjice povezane upravo s metabolizmom željeza. Neke od njih su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Friedreichova ataksija, ...

Željezo je najzastupljenije u hemu, dok je najveća količina nehemskog željeza pohranjena u jetri te svaki poremećaj u njegovu metabolizmu izaziva različita oštećenja tog organa. Jedna od najpoznatijih bolesti jetre povezana s metabolizmom željeza je svakako hemokromatoza opisana u trećem poglavlju.

Za praćenje količine željeza u jetri i drugim organima kako bi se opisala različita oštećenja i patološka stanja u organizmu koriste se mnoge histokemijske metode. Jedna od najstarijih , ali i danas najčešće korištenih je svakako Perlova metoda koja ima niz prednosti nad ostalima. Široko je primijenjena, koristi se za dokazivanje odnosno lokalizaciju željezovih iona u jetri, mozgu, bubrezima, koži, te se nekim inovacijama i kombinacijama s drugim metodama svakim danom sve više usavršava. Bitne su za spomenuti i Turnbull metoda, sulfidna metoda te fluorescencijska metoda koje različitim modifikacijama također pružaju visoku osjetljivost na ione željeza. Histokemija željeza u tkivima daje nam informacije u eksperimentalnim i patološkim istraživanjima. Ima poprilično dugu povijest i s vremenom se sve više razvija. Daje nam uvid o sudjelovanju željeza u degenerativnim promjenama tkiva te u karakterizaciji i dijagnosticiranju različitih bolesti. Jedna od prvih bolesti okarakterizirana histokemijom željeza je Hallervorden – Spatz sindrom, a danas se spomenute metode koriste za karakterizaciju ogromnog broja poremećaja , te na taj način znatno olakšavaju liječenje. U skoroj budućnosti nas vjerojatno očekuju i primjene novih te inovacije u starim histokemijskim metodama dokazivanja željeza u organizmu koje će biti još osjetljivije i jednostavnije, te će davati i bolje rezultate.

LITERATURA

1. Gamulin S., K.Z., Marušić M., *Patofiziologija*, M. naklada, Editor. 2002. p. 225-227.
2. Dale M.M., M.P.K., Rang H.P., Ritter J.M., *Farmakologija*. 2006, Tehnička knjiga. p. 330-333.
3. Meguro, R., et al., *Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review.* Arch Histol Cytol, 2007. **70**(1): p. 1-19.
4. Damjanov I., J.S., Nola M., *Patologija*. 2008, Medicinska naklada.
5. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism.* N Engl J Med, 1999. **341**(26): p. 1986-95.
6. Boddy-Evans, M., *The accidental discovery of Prussian blue.* 2006.
7. http://painting.about.com/cs/colortheory/a/prussianblue.htm.
8. Meguro, R., et al., *Perfusion-Perls and -Turnbull methods supplemented by DAB intensification for nonheme iron histochemistry: demonstration of the superior sensitivity of the methods in the liver, spleen, and stomach of the rat.* Histochem Cell Biol, 2003. **120**(1): p. 73-82.
9. http://www.springerlink.com/content/jrd9fbgq669cg1hu/.
10. Petrat, F., H. de Groot, and U. Rauen, *Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells.* Biochem J, 2001. **356**(Pt 1): p. 61-9.

SAŽETAK

Uloga željeza u organizmu je jako bitna i raznolika. Željezo je esencijalni element i možemo ga podijeliti na hemsko i nehemsko. Pojam nehemsko željezo podrazumijeva heterogene vrste željezovih kompleksa u kojima je željezo slabo vezano na organske baze i proteine niske molekulske mase, za razliku od hemskog željeza gdje je taj element vezan na protoporfirinski prsten velike molekulske mase.

Za histokemiju nehemskog željeza otopljenog u kiseloj otopini koriste se dvije histokemijske metode: Perlova i Turnbull metoda te i druge metode koje koriste kelatore željeza i ovise o stvaranju netopivih čestica željeza. Najčešće korištena u laboratorijima je Perlova metoda i njome se mogu dokazati i fero i feri ioni željeza, dok je Turnbull metoda specifična samo za fero ione. Međutim, perfuzijom Turnbull metode *in vivo* može se jasno pokazati distribucija feri željeza, osobito u lizosomima.

Za elektronsku mikroskopiju Perlova i Turnbull reakcija se mogu pojačati DAB/ srebro/ zlato metodom da bi vizualizacija željeza bila što bolja, te se primjenjuju i željezo sulfid metoda kao i bojenje redox–aktivnog željeza vodikovim peroksidom ili DAB-om.

Unatoč svim prednostima opisanih metoda, kvantitativna mjerenja željeza u pojedinim uzorcima su dosta kompliciranа i teško izvediva. Danas se za kvantitativnu procjenu kelatirajućeg Fe^{2+} najboljom pokazala metoda zasnovana na suzbijanju flourescencije indikatora metala (PG , SK, rodaina, kalceina, ...) te na njenom ponovnom uspostavljanju poznatim količinama različitih kelatora dvovalentnih metala, opisana u poglavlju 5.2.

Sve spomenute metode imaju veliku ulogu u dijagnosticiranju različitih poremećaja i oštećenja tkiva.

SUMMARY

The role of iron in the body is very important and diverse. Iron is an essential element and we can devide it on hem and nonheme iron. The term nonheme iron includes heterogeneous types of complexes in which iron is loosely bound to low-molecular weight organic bases and proteins, unlike hem iron where this element is linked to the high molecular weight protoporphyrin ring.

For histochemistry of nonheme iron dissolved in acid solution , in use are two histochemical methods: Perls and Turnbull method and other methods using iron chelators and dependent on the creation of insoluble particles of iron. The most commonly used in laboratories is a Perls method and it stains ferrous and ferric iron ions, while the Turnbull method is specific only to ferrous ions. However, perfusion Turnbull methods *in vivo* can clearly demonstrate the distribution of ferrous iron, particularly in the lysosomes.

For electron microscopy Perls and Turnbull reactions are enhanced by DAB / silver / gold method for better visualization and iron sulfide staining methods as well as redox-active iron with hydrogen peroxide or DAB-om are also applicable for electon microscopy.

Despite all the advantages of the described methods, quantitative measurements of iron in some samples are quite complicated and difficult feasible. Today, for the quantitative assessment of chelating Fe^{2+} showed the best method based on quenching fluorescence metal indicators (PG, SG, rodaina, kalceina, ...) and its dequenching of the known quantities of various divalent metal chelating treatment, described in section 5.2.

All these methods have an important role in the diagnosis of various disorders and tissue damage.