



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Rolul fierului și al compușilor de fier în inițierea și întreținerea ulcerului venos de gambă

Doctorand: **Dan Petru Constantinescu**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Insuficiența venoasă cronică	5
1.1. Generalități	5
1.2. Etiopatogenia	5
1.3. Mecanismele implicate	8
1.4. Manifestările clinice	9
1.5. Morfopatologia în insuficiența venoasă cronică	11
2. Ulcerul venos al gambei	13
2.1. Generalități	13
2.2. Etiopatogenie	13
3. Fierul în organism	14
3.1. Absorbția, transportul și distribuția	14
3.2. Rolul paradoxal al fierului în homeostazia redox	16
3.3. Cascada inflamatorie dependentă de fier în insuficiența venoasă cronică	17
3.4. Fierul și ulcerul varicos	18
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	21
1. Obiective	23
2. Metodologie generală	25
2.1. Determinarea activității metaloproteinazelor	25
2.2. Metode biochimice de dozare a indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți	25
2.3. Metoda chirurgicală de inducere a insuficienței venoase cronice	27
2.4. Metoda de omogenare tisulară	28
2.5. Prelucrarea statistică	29
3. Studiul 1. Studiu clinic privind rolul fierului în insuficiența venoasă cronică	31
3.1. Introducere	31
3.2. Obiective	31
3.3. Material și metode	32
3.4. Rezultate	33
3.5. Discuții	37
3.6. Concluzii	39
4. Studiul 2. Metaloproteinazele matriceale în insuficiența venoasă cronică	41
4.1. Introducere	41
4.2. Obiective	41
4.3. Material și metode	42
4.4. Rezultate	43
4.5. Discuții	50
4.6. Concluzii	54
5. Studiul 3. Tratamentul cu Desferal și balanța oxidanți/antioxidanți în insuficiența venoasă cronică experimentală	55
5.1. Introducere	55

5.2. Obiective	56
5.3. Material și metode	56
5.4. Rezultate	56
5.5. Discuții	72
5.6. Concluzii	77
6. Studiul 4. Tratamentul cu Curcumină și balanța oxidanți/antioxidanți în insuficiența venoasă cronică experimentală	79
6.1. Introducere	79
6.2. Obiective	79
6.3. Material și metode	80
6.4. Rezultate	80
6.5. Discuții	94
6.6. Concluzii	99
7. Discuții generale	101
8. Concluzii generale	103
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

Cuvinte cheie: insuficiența venoasă cronică, fier, stres oxidativ, metaloproteinaze, desferal, curcumină

INTRODUCERE

Insuficiența venoasă cronică (IVC) a membrelor inferioare este o problemă importantă de sănătate publică, care înglobează toate manifestările clinice legate de anomaliile morfologice sau funcționale ale sistemului venos, fie congenitale, fie dobândite, care în stadiul cel mai avansat sunt asociate cu ulcerul venos.

Această patologie este foarte frecventă, ducând la alterarea calității vieții și afectarea bugetului alocat sănătății.

În etiopatogenia insuficienței venoase cronice și ulcerului venos au fost implicate o serie de mecanisme: activarea leucocitelor, matricea extracelulară și metaloproteinazele matriceale (MMP), citokinele și fibroza tisulară, fibroblastele dermice, cascada inflamatorie și fierul (Fe), stresul oxidativ.

Eliberarea ionilor de fier este considerată ca un stimul în formarea speciilor reactive de oxigen (SRO) și cauzarea stresului oxidativ (SO), cu provocarea unei activări a MMP în IVC.

Interesul pentru tratamentul pacienților cu IVC și ulcer m-au motivat în cercetarea de față pentru a investiga atât implicația Fe în etiopatogenia IVC, cât și căutarea unei terapii care să aibă efecte favorabile în apărarea antioxidantă.

CONTRIBUȚIA PERSONALA

OBIECTIVE

Importanța acordată fierului în etiopatogenia IVC m-a determinat să studiez:

- pe subiecți umani, pacienți cu IVC:
 - corelația între Fe și balanța oxidanți/antioxidanți (O/AO) la nivel tisular,
 - implicarea MMP-2 și MMP-9,
 - corelația între MMP-2 și MMP-9 și balanța O/AO,
 - corelația între liganții proteici ai Fe (transferina și feritina) și MMP-2 și MMP-9;
- pe șobolani, la care s-a indus experimental IVC:
 - efectul administrării de Desferal și Curcumină, chelatori de Fe cu rol antioxidant, asupra balanței O/AO la nivel seric și tisular, în omogenatul muscular și venos,
 - efectul comparativ al Desferalului versus Curcumină în aceleași condiții.

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul clinic a fost un studiu de tip prospectiv pe pacienți cu insuficiență venoasă cronică internați în Clinica Chirurgie II Cluj Napoca în conformitate cu legislația în vigoare.

Studiile experimentale, pe șobolani, au fost studii de tip analitic longitudinal prospectiv pe loturi de șobolani albi, rasa Wistar. Pe timpul cercetării experimentale a fost respectată legislația în vigoare privind protecția animalelor.

Determinarea activității metaloproteinelor tisulare s-a făcut prin electroforeză verticală în Laboratorul de Radioterapie, Radiobiologie și Biologie Tumorală, de la Institutul Oncologic "Prof. Dr. I Chiricuța" Cluj-Napoca.

Metode biochimice de dozare a indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți. La animalele din studiul experimental s-au determinat indicatorii balanței O/AO: pentru stresul oxidativ - malondialdehida, proteinele carbonilate, ceruloplasmina și pentru apărarea antioxidantă - glutatationul oxidat și glutatationul redus. Determinările biochimice s-au efectuat în Laboratorul pentru Studiul Stresului Oxidativ de la Disciplina de Fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Metoda chirurgicală de inducere a insuficienței venoase cronice. Insuficiența venoasă cronică la șobolani a fost indusă prin ligatura venei femurale comune, la membrul inferior drept, după metoda descrisă de Pascarella.

Prelucrarea statistică s-a efectuat cu programul StatsDirect v.2.7.2. și cu aplicația Excel (din pachetul Microsoft Office 2007).

STUDIUL 1. Studiu clinic privind rolul fierului în insuficiența venoasă cronică

Obiective: Obiectivul studiului este demonstrarea corelației dintre fierul sub formă liberă sau legată de la nivel tisular și markerii balanței O/AO tisulari, reprezentați de malondialdehidă (MDA) - un marker al peroxidării lipidelor, GSH (glutatationul redus) ca antioxidant, GSSH (glutatationul oxidat) și raportul GSH/GSSG în patogenia ulcerului venos de gambă.

Loturi: S-au prelevat fragmente tisulare de la nivelul marginii ulcerului (n=40) și fundului ulcerului (n=40) și de la nivelul tegumentului sănătos de la același membru inferior (n=40), în cursul intervenției chirurgicale pentru cura operatorie a bolii venoase

cronice primare. Fragmentele tisulare recoltate au fost împărțite în 3 loturi, după cum urmează: lot I – fundul ulcerului (n=40), lot II – marginea ulcerului (n=40), lot III – tegumentul sănătos (n=40). La aceste loturi am determinat markerii balanței O/AO, iar pentru evidențierea hemosiderinei probele au fost procesate pentru colorația hematoxilină eozină și colorația Perl's.

Rezultate: MDA este prezentă în concentrații semnificativ crescute la pacienții cu ulcer venos de gambă, la nivelul probelor prelevate din fundul ulcerului, față de probele prelevate de la nivelul marginilor ulcerului și tegumentului sănătos. Acest lucru sugerează că stresul oxidativ joacă un rol important în patogeneza ulcerului venos de gambă la pacienții cu IVC. Prezența fierului sub formă de hemosiderină la nivelul ulcerului poate duce la creșterea de specii reactive de oxigen. Studiul de față aduce dovezi privind implicarea fierului în etiopatogenia ulcerului venos de gambă, susținând și teoria stresului oxidativ.

STUDIUL 2. Metaloproteinazele matriceale în insuficiența venoasă cronică

Obiective: în acest studiu ne-am propus să studiem: implicarea MMP-2 și MMP-9 în etiopatogeneza IVC; homeostazia redox și influența asupra MMP-2 și MMP-9 în IVC; legătura între agenții liganți proteici ai Fe (transferina și feritina) și MMP-2 și MMP-9 în IVC.

Loturi: Pacienții luați în studiu au fost selectați dintre cei din studiul 1, în baza aceluiași criterii. Loturile studiate au fost constituite în funcție de fragmentul tisular recoltat după cum urmează: lot I – martor – tegument sănătos (n = 40); lot II - fundul ulcerului (n = 40); lot III – marginea ulcerului (n = 40). Pe aceste loturi s-au determinat parametrii tisulari ai stresului oxidativ și MMP-2, MMP-9. La pacienții incluși în studiu s-au prelevat probe de sânge venos de la nivelul membrului superior pentru determinarea fierului seric, feritinei și transferinei serice.

Rezultate: În insuficiența venoasă cronică și ulcerul venos al membrelor inferioare sunt implicate MMP-9, care cresc semnificativ la nivelul fundului și marginilor ulcerului. Creșterea semnificativă a nivelului MMP-9 se corelează cu modificările nivelului Fe seric. Prin efectul prooxidant și de hiperactivare a MMP-9, Fe poate fi implicat în insuficiența venoasă cronică și ulcerul venos al membrelor inferioare.

STUDIUL 3. Tratamentul cu Desferal și balanța oxidanți/antioxidanți în insuficiența venoasă cronică experimentală

Obiective: Am urmărit experimental, pe șobolani, la care s-a indus IVC, prin ligatura venei femurale, următoarele: modificările balanței O/AO la nivel seric, în omogenatul tisular din musculatura bicepsului femural al membrului cu vena ligaturată și în omogenatul tisular din vena femurală ligaturată; efectul administrării de Desferal asupra balanței O/AO la nivel seric, în omogenatul tisular din musculatura bicepsului femural al membrului cu vena ligaturată și în omogenatul tisular din vena femurală ligaturată; efectele longitudinale ale administrării de Desferal în momentele T₁, T₂, T₃ și T₄ (zilele 3, 7, 14 și 21)

Loturi:

- lot I – martor
- lot II – ligatura și recoltări în momentele - T₁ - la 3 zile, T₂ – la 7 zile, T₃ – la 14 zile, T₄ – la 21 zile;
- lot III – martor + Desferal și recoltări în momentele - T₁ – la 3 zile, T₂ – la 7 zile,

T3 – la 14 zile, T4 – la 21 zile

- lot IV – ligatura + Desferal și recoltări în momentele- T1 - la 3 zile, T2 – la 7 zile, T3 – la 14 zile, T4 – la 21 zile

Rezultate: IVC indusă experimental determină creșterea SO la nivel seric și muscular, pe seama MDA și GSSG. Administrarea Desferalului determină creșteri ale apărării AO, pe seama GSH la nivel seric la animalele martor. Administrarea Desferalului la animalele cu IVC indusă experimental determină scăderea SO, pe seama MDA, la nivel seric, muscular și venos, față de animalele netratate. Datele noastre, testate experimental pe șobolani, au relevanță clinică, recomandând utilizarea Desferalului în tratamentul IVC.

STUDIUL 4. Tratamentul cu Curcumină și balanța oxidanți/antioxidanți în insuficiența venoasă cronică experimentală

Obiective: Am urmărit experimental, pe șobolani, la care s-a indus IVC: modificările balanței O/AO la nivel seric, în omogenatul din musculatura bicepsului femural a membrului cu vena ligaturată și în omogenatul tisular din vena femurală ligaturată; efectul administrării de Curcumină asupra balanței O/AO la nivel seric, în omogenatul din musculatura coapsei membrului cu vena ligaturată și în omogenatul tisular venos femural; efectul comparativ al administrării de Desferal versus Curcumină asupra indicatorilor balanței O/AO la nivel seric, în omogenatul tisular muscular și venos.

Loturi:

- lot I – martor;
- lot II – ligatură și recoltări în momentele T1 - la 3 zile, T2 – la 7 zile, T3 – la 14 zile, T4 – la 21 zile;
- lot V – martor + Curcumină și recoltări în momentele T1 - la 3 zile, T2 – la 7 zile, T3 – la 14 zile, T4 – la 21 zile;
- lot VI – ligatură + Curcumină și recoltări în momentele - T1 - la 3 zile, T2 – la 7 zile, T3 – la 14 zile, T4 – la 21 zile.

Rezultate: Tratamentul cu Curcumină determină scăderi ale SO, pe seama MDA la nivel tisular în omogenatul muscular și venos și creșteri ale apărării AO, pe seama CP și GSH la nivel seric și a GSH la nivel muscular. La animalele cu IVC, tratate cu Curcumină, se constată scăderi ale SO, pe seama MDA la nivel tisular, în omogenatul muscular și venos. La animalele cu IVC, tratate cu Curcumină, se constată, comparativ cu administrarea de Desferal, menținerea crescută a SO, pe seama MDA la nivel seric, a PC la nivel muscular și scăderi ale SO, pe seama MDA la nivel venos. La animalele cu IVC, tratate cu Curcumină, comparativ cu cele tratate cu Desferal, se constată scăderi ale apărării AO, pe seama CP și GSH la nivel seric și creșteri ale apărării AO, pe seama GSH, la nivel muscular. Tratamentul cu Desferal, la animalele cu IVC indusă experimental, are efecte favorabile semnificativ superioare, comparativ cu tratamentul cu Curcumină, de scădere a SO la nivel seric și muscular și de creștere a apărării AO la nivel seric.

DISCUȚII

Cercetările clinice pe pacienți cu IVC și ulcer venos arată:

- implicația SO în etiopatogenia IVC;
- rolul Fe, prezent sub formă de hemosiderină, ca sursă alternativă de SRO la nivel tisular;

- implicarea MMP-9 și corelarea acestora cu modificările Fe seric;
- efectul prooxidant și de hiperactivare a MMP-9 al Fe;
- modificările semnificative care apar la nivelul fundului ulcerului.

Cercetările experimentale pe animale la care s-a indus IVC și ulcer venos arată:

- creșterea SO la nivel seric și muscular;
- efectele favorabile antioxidante la nivel seric, muscular și venos ale Desferalului, de scădere a SO și de creștere a apărării AO;
- efectele favorabile antioxidante ale administrării de Curcumină, în omogenatul tisular, muscular și venos;
- superioritatea tratamentului cu Desferal versus Curcumină, de scădere a SO la nivel seric și muscular.

Fierul are un efect dual, atât prooxidant, cât și antioxidant:

- complexat cu agenții proteici liganți naturali;
- complexat cu alți agenți chelatori naturali (ex. Curcumina);
- complexat cu agenți chelatori sintetici (ex. Desferalul).

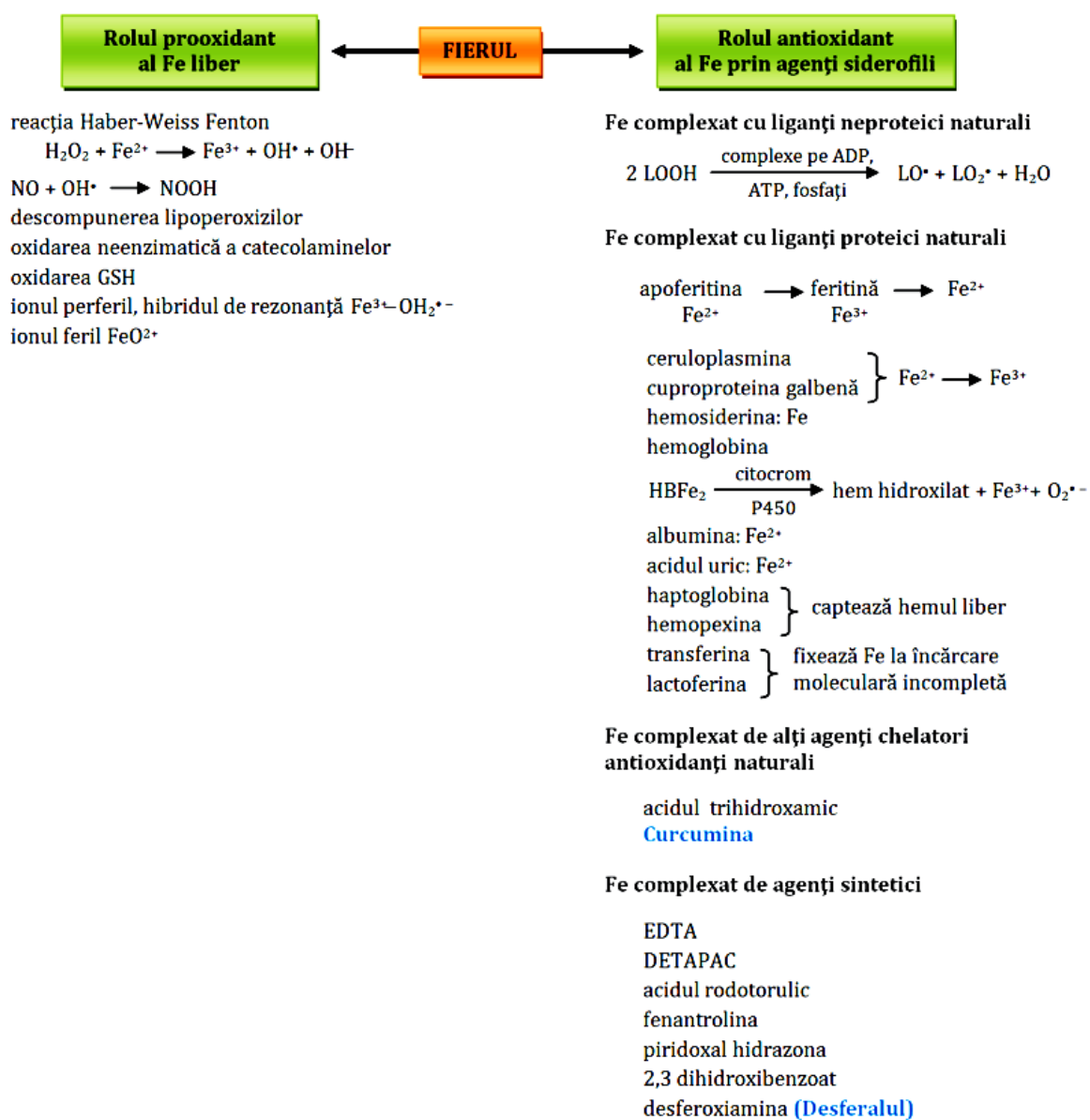


Fig. 1. Rolul paradoxal al fierului în homeostazia redox

CONCLUZII GENERALE

1. Stresul oxidativ joacă un rol important în patogeneza IVC și ulcerului venos. Concentrația semnificativ crescută de MDA la nivelul fundului ulcerului venos de gambă, față de marginile ulcerului și tegumentul sănătos, susține teoria SO.

2. Creșterea SO în IVC poate fi determinată de prezența fierului sub formă de hemosiderină la nivelul ulcerului venos.

3. Creșterea semnificativă a MMP-9 în IVC și ulcerul venos al membrelor inferioare, evidențiată la nivelul fundului și marginilor ulcerului, poate fi atribuită degradării matricei extracelulare, cauzată de efectul prooxidant al fierului și de hiperactivarea MMP-9.

4. Administrarea de Desferal în IVC indusă experimental contribuie la scăderea SO la nivel seric, muscular și venos și aduce argumente indirecte pentru efectul prooxidant al fierului, având în vedere rolul Desferalului ca și chelator sintetic de fier.

5. Administrarea de Curcumină la animale cu IVC indusă experimental determină scăderea SO la nivel tisular, în omogenatul muscular și venos și aduce argumente indirecte pentru implicarea fierului, având în vedere rolul Curcuminei ca și chelator natural de fier.

6. Tratamentul cu Desferal, la animale cu IVC indusă experimental, are efecte favorabile semnificative, superioare comparativ cu tratamentul cu Curcumină, în ceea ce privește scăderea SO la nivel seric și muscular și creșterea apărării AO la nivel seric.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

The role of iron and iron compounds in initiating and maintaining venous leg ulcer

Doctoral candidate: **Dan Petru Constantinescu**

Doctoral supervisor: **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**

CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	3
1. Chronic venous insufficiency	5
1.1. General issues	5
1.2. Etiopathogeny	5
1.3. Mechanisms involved	8
1.4. Clinical manifestations	9
1.5. Pathomorphology in chronic venous insufficiency	11
2. Venous leg ulcer	13
2.1. General issues	13
2.2. Etiopathogeny	13
3. Iron in the body	14
3.1. Absorption, transport and distribution	14
3.2. The paradoxical role of iron in redox homeostasis	16
3.3. The iron-dependent cascade in chronic venous insufficiency	17
3.4. Iron and varicose ulcer	18
PERSONAL CONTRIBUTION	21
1. Objectives	23
2. General methodology	25
2.1. Determination of metalloproteinase activity	25
2.2. Biochemical methods for measurement of the oxidant/antioxidant balance indicators	25
2.3. The surgical method for induction of chronic venous insufficiency	27
2.4. The tissue homogenization method	28
2.5. Statistical processing	29
3. Study 1. A clinical study on the role of iron in chronic venous insufficiency	31
3.1. Introduction	31
3.2. Objectives	31
3.3. Material and methods	32
3.4. Results	33
3.5. Discussions	37
3.6. Conclusions	39
4. Study 2. Matrix metalloproteinases in chronic venous insufficiency	41
4.1. Introduction	41
4.2. Objectives	41
4.3. Material and methods	42
4.4. Results	43
4.5. Discussions	50
4.6. Conclusions	54
5. Study 3. Desferal treatment and the oxidant/antioxidant balance in experimental chronic venous insufficiency	55
5.1. Introduction	55

5.2. Objectives	56
5.3. Material and methods	56
5.4. Results	56
5.5. Discussions	72
5.6. Conclusions	77
6. Study 4. Curcumin treatment and the oxidant/antioxidant balance in experimental chronic venous insufficiency	79
6.1. Introduction	79
6.2. Objectives	79
6.3. Material and methods	80
6.4. Results	80
6.5. Discussions	94
6.6. Conclusions	99
7. General discussions	101
8. General conclusions	103
9. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107

Key words: chronic venous insufficiency, iron, oxidative stress, metalloproteinases, desferal, curcumin

INTRODUCTION

Chronic venous insufficiency (CVI) of the lower limbs is an important public health problem, which encompasses all clinical manifestations related to morphological or functional abnormalities of the venous system, either congenital or acquired, which in the most advanced stage are associated with venous ulcer.

This pathology is extremely frequent, leading to an alteration of the quality of life and affecting the budget allocated to health care.

A number of mechanisms have been involved in the etiopathogeny of chronic venous insufficiency and venous ulcer: leukocyte activation, the extracellular matrix and matrix metalloproteinases (MMP), cytokines and tissue fibrosis, dermal fibroblasts, the inflammatory cascade and iron (Fe), oxidative stress.

The release of iron ions is considered to be a stimulus in the formation of reactive oxygen species (ROS) and the induction of oxidative stress (OS), with an activation of MMP in CVI.

My interest in the treatment of patients with CVI and ulcer motivated me to conduct this research, in order to investigate the implication of Fe in the etiopathogeny of CVI, as well as to find a treatment with favorable effects in antioxidant defense.

PERSONAL CONTRIBUTION

OBJECTIVES

The importance given to iron in the etiopathogeny of CVI led me to study:

- in human subjects, patients with CVI:
 - the correlation between Fe and the tissue oxidant/antioxidant (O/AO) balance,
 - the implication of MMP-2 and MMP-9,
 - the correlation between MMP-2 and MMP-9 and the O/AO balance,
 - the correlation between protein Fe ligands (transferrin and ferritin) and MMP-2 and MMP-9;
- in rats with experimentally induced CVI:
 - the effect of the administration of Desferal and Curcumin, Fe chelators with an antioxidant role, on the O/AO balance in serum and in muscle and vein tissue homogenate,
 - the comparative effect of Desferal and Curcumin under the same conditions.

MATERIAL AND METHOD

The clinical study was a prospective study performed in patients with chronic venous insufficiency admitted to the Surgical Clinic II Cluj-Napoca, according to the legislation in force.

The experimental studies on rats were analytical prospective longitudinal studies on groups of white Wistar rats. During the experimental research, the legislation in force regarding animal protection was observed.

Tissue metalloproteinase activity was determined by vertical electrophoresis in the Radiotherapy, Radiobiology and Tumor Biology Laboratory of the "Prof. Dr. I Chiricuță" Oncology Institute Cluj-Napoca.

Biochemical methods for measurement of the oxidant/antioxidant balance indicators. In the animals of the experimental study, the O/AO balance indicators were determined: for oxidative stress – malondialdehyde, protein carbonyls, ceruloplasmin, and for antioxidant defense – oxidized glutathione and reduced glutathione. Biochemical determinations were performed in the Laboratory for the Study of Oxidative Stress of the Physiology Department of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The surgical method for induction of chronic venous insufficiency. Chronic venous insufficiency in rats was induced by common femoral vein ligation, in the right lower limb, according to the method described by Pascarella.

Statistical processing was performed using the StatsDirect v.2.7.2. software and the Excel application (Microsoft Office 2007).

STUDY 1. A clinical study on the role of iron in chronic venous insufficiency

Objectives: The objective of the study was to demonstrate the correlation between tissue free or bound iron and tissue O/AO balance markers, represented by malondialdehyde (MDA) - a marker of lipid peroxidation, GSH (reduced glutathione) as an antioxidant, GSSH (oxidized glutathione) and the GSH/GSSG ratio in the pathogenesis of venous leg ulcer.

Groups: Tissue fragments were taken from the margin (n=40) and bottom (n=40) of the ulcer, as well as from healthy skin from the same lower limb (n=40), during surgery for the operative treatment of primary chronic venous disease. The collected tissue fragments were divided into 3 groups, as follows: group I – bottom of the ulcer (n=40), group II – margin of the ulcer (n=40), group III – healthy skin (n=40). In these groups, the markers of the O/AO balance were determined and to evidence hemosiderin, the samples were processed for hematoxylin-eosin stain and Perl's stain.

Results: MDA was present in significantly higher concentrations in patients with venous leg ulcer, in samples taken from the bottom of the ulcer compared to samples taken from the margin of the ulcer and healthy skin. This suggests that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of venous leg ulcer in patients with CVI. The presence of iron in the form of hemosiderin in the ulcer can lead to an increase of reactive oxygen species. This study provides evidence regarding the implication of iron in the etiopathogeny of venous leg ulcer, also supporting the theory of oxidative stress.

STUDY 2. Matrix metalloproteinases in chronic venous insufficiency

Objectives: In this study, we aimed to investigate: the implication of MMP-2 and MMP-9 in the etiopathogenesis of CVI; redox homeostasis and its influence on MMP-2 and MMP-9 in CVI; the relationship between protein Fe ligands (transferrin and ferritin) and MMP-2 and MMP-9 in CVI.

Groups: The patients included in the study were selected from those of study 1, based on the same criteria. The studied groups were formed depending on the collected tissue fragment as follows: group I – control group – healthy skin (n = 40); group II – bottom of the ulcer (n = 40); group III – margin of the ulcer (n = 40). In these groups, tissue oxidative stress parameters and MMP-2, MMP-9 were determined. Venous blood samples were taken from the upper limb of the patients included in the study, for determination of serum iron, ferritin and transferrin.

Results: MMP-9 are involved in chronic venous insufficiency and venous ulcer of the lower limbs, and their levels are significantly increased at the bottom and margins of the ulcer. The significant increase of MMP-9 levels is correlated with changes in serum Fe levels. Through its pro-oxidant and MMP-9 hyperactivation effect, Fe can be implicated in chronic venous insufficiency and venous ulcer of the lower limbs.

STUDY 3. Desferal treatment and the oxidant/antioxidant balance in experimental chronic venous insufficiency

Objectives: The following were experimentally studied in rats with CVI induced by femoral vein ligation: changes in the O/AO balance in serum, in tissue homogenate from the femoral biceps muscle of the ligated vein limb and in tissue homogenate from the ligated femoral vein; the effect of Desferal administration on the O/AO balance in serum, in tissue homogenate from the femoral biceps muscle of the ligated vein limb and in tissue homogenate from the ligated femoral vein; the longitudinal effects of Desferal administration at times T₁, T₂, T₃ and T₄ (days 3, 7, 14 and 21).

Groups:

- group I – control group;
- group II – vein ligation and sample collection at times T₁ – at 3 days, T₂ – at 7 days, T₃ – at 14 days, T₄ – at 21 days;
- group III – control group + Desferal and sample collection at times T₁ – at 3 days,

T2 – at 7 days, T3 – at 14 days, T4 – at 21 days;

- group IV – vein ligation + Desferal and sample collection at times T1 - at 3 days, T2 – at 7 days, T3 – at 14 days, T4 – at 21 days.

Results: Experimentally induced CVI causes an increase of serum and muscle OS on account of MDA and GSSG. Desferal administration induces an increase of serum AO defense on account of GSH in control animals. Desferal administration in animals with experimentally induced CVI determines a decrease of serum, muscle and venous OS on account of MDA compared to untreated animals. Our data, experimentally tested in rats, have clinical relevance, recommending the use of Desferal in the treatment of CVI.

STUDY 4. Curcumin treatment and the oxidant/antioxidant balance in experimental chronic venous insufficiency

Objectives: The following were experimentally studied in rats with induced CVI: changes in the O/AO balance in serum, in tissue homogenate from the femoral biceps muscle of the ligated vein limb and in tissue homogenate from the ligated femoral vein; the effect of Curcumin administration on the O/AO balance in serum, in tissue homogenate from the thigh muscle of the ligated vein limb and in femoral vein tissue homogenate; the comparative effect of Desferal and Curcumin administration on the O/AO balance indicators in serum, in muscle and vein tissue homogenate.

Groups:

- group I – control group;
- group II – vein ligation and sample collection at times T1 - at 3 days, T2 – at 7 days, T3 – at 14 days, T4 – at 21 days;
- group V – control group + Curcumin and sample collection at times T1 - at 3 days, T2 – at 7 days, T3 – at 14 days, T4 – at 21 days;
- group VI – vein ligation + Curcumin and sample collection at times T1 - at 3 days, T2 – at 7 days, T3 – at 14 days, T4 – at 21 days.

Results: Curcumin treatment induced a decrease of OS on account of MDA in muscle and vein tissue homogenate, and an increase of AO defense on account of CP and GSH in serum and GSH in muscle tissue. In animals with CVI, treated with Curcumin, there was a decrease of OS on account of MDA in muscle and vein tissue homogenate. In animals with CVI, treated with Curcumin compared to Desferal administration, OS levels remained high on account of MDA in serum and PC in muscle tissue, and there was a decrease of OS on account of MDA in vein tissue. In animals with CVI, treated with Curcumin compared to Desferal, there was a decrease of AO defense on account of CP and GSH in serum and an increase of AO defense on account of GSH in muscle. Desferal treatment in animals with experimentally induced CVI had significantly more favorable effects compared to Curcumin treatment in decreasing serum and muscle OS and increasing serum AO defense.

DISCUSSIONS

The clinical research in patients with CVI and venous ulcer showed:

- the implication of OS in the etiopathogeny of CVI;
- the role of Fe, present in the form of hemosiderin, as an alternative source of ROS in tissue;
- the implication of MMP-9 and their correlation with serum Fe changes;
- the pro-oxidant and MMP-9 hyperactivation effect of Fe;

- significant changes occurring at the bottom of the ulcer.
- The experimental studies in animals with induced CVI and venous ulcer showed:
- an increase of serum and muscle OS;
 - favorable antioxidant effects of Desferal in serum, muscle and vein tissue, causing a decrease of OS and an increase of AO defense;
 - favorable antioxidant effects of Curcumin administration in muscle and vein tissue homogenate;
 - a superior effect of Desferal versus Curcumin treatment in decreasing serum and muscle OS.

Iron has a dual pro-oxidant and antioxidant effect:

- complexed with natural protein ligands;
- complexed with other natural chelating agents (e.g., Curcumin);
- complexed with synthetic chelating agents (e.g., Desferal).

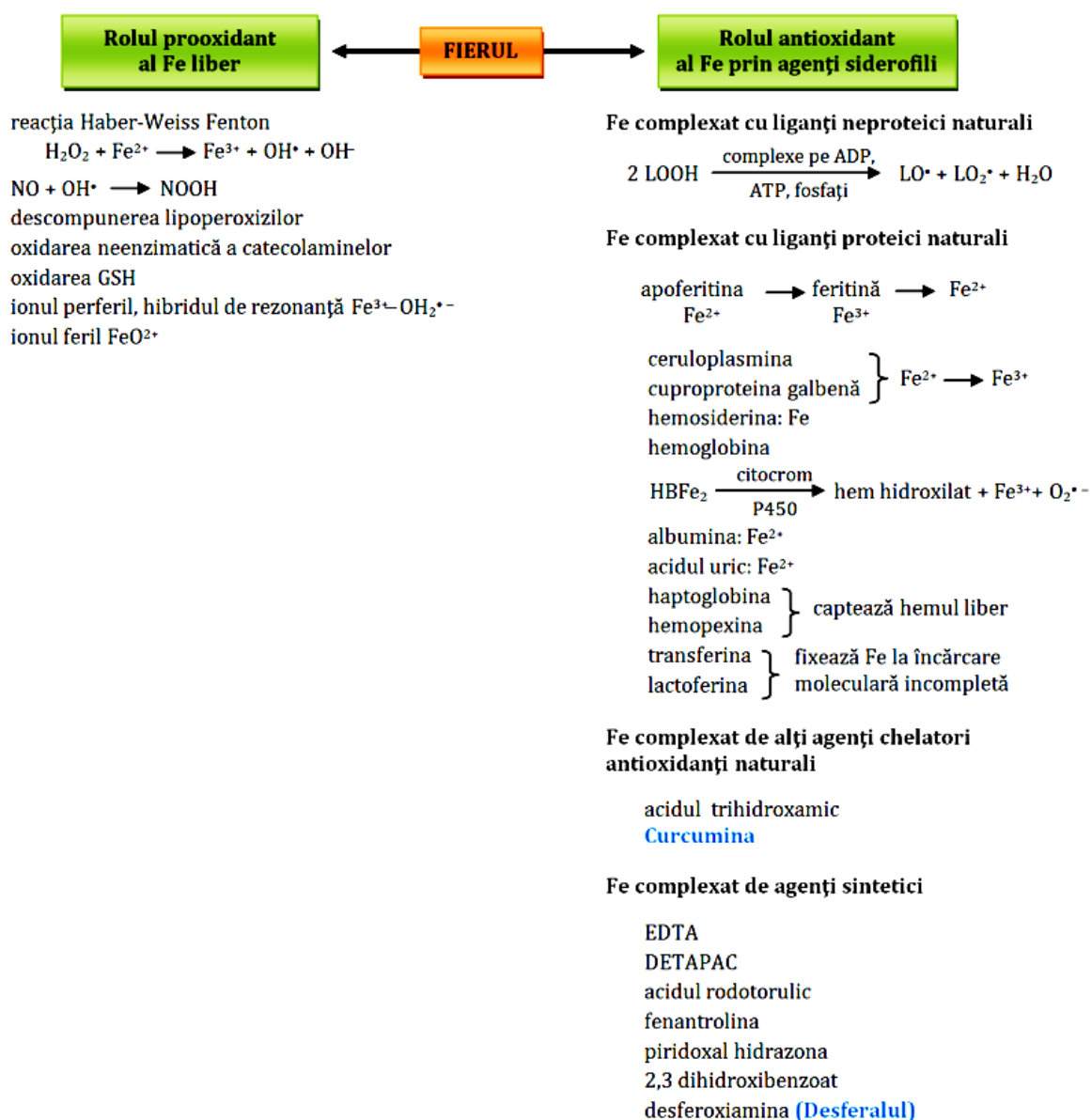


Fig. 1. The paradoxical role of iron in redox homeostasis

The pro-oxidant role of free Fe

Haber-Weiss Fenton reaction

lipoperoxide decomposition

non-enzymatic oxidation of catecholamines
oxidation of GSH
perferryl ion, resonance hybrid
ferryl ion

IRON

The antioxidant role of Fe through siderophile agents

Fe complexed with natural non-protein ligands

ADP complexes

ATP, phosphates

Fe complexed with natural protein ligands

apoferritin → ferritin →

ceruloplasmin

yellow copper protein

hemosiderin

hemoglobin

cytochrome hydroxylated heme

albumin

uric acid

haptoglobin capture free heme

hemopexin

transferrin bind Fe during incomplete

lactoferrin molecular loading

Fe complexed with other natural antioxidant chelating agents

trihydroxamic acid

Curcumin

Fe complexed with synthetic agents

EDTA

DETAPAC

rhodotorulic acid

phenanthroline

pyridoxal hydrazone

2,3 dihydroxybenzoate

desferrioxamine (Desferal)

GENERAL CONCLUSIONS

7. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of CVI and venous ulcer. The significantly increased MDA concentration at the bottom of the venous leg ulcer compared to the margins of the ulcer and healthy skin supports the theory of OS.

8. The increase of OS in CVI can be caused by the presence of iron in the form of hemosiderin at the level of the venous ulcer.

9. The significant increase of MMP-9 in CVI and venous ulcer of the lower limbs, evidenced at the bottom and margins of the ulcer, can be attributed to the degradation of the extracellular matrix, induced by the pro-oxidant effect of iron and MMP-9 hyperactivation.

10. Desferal administration in experimentally induced CVI contributes to the decrease of serum, muscle and venous OS and provides indirect arguments in favor of the pro-oxidant effect of iron, given the role of Desferal as a synthetic iron chelator.

11. Curcumin administration in animals with experimentally induced CVI causes a decrease of OS in muscle and vein tissue homogenate and provides indirect arguments for the implication of iron, given the role of Curcumin as a natural iron chelator.

12. Desferal treatment in animals with experimentally induced CVI has significant favorable effects, superior compared to Curcumin treatment, in decreasing serum and muscle OS and increasing serum AO defense.