

ВЛИЯНИЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СОЛЕЙ ЖЕЛЕЗА И МЕДИ НА ИНИЦИАЦИЮ АДИПОГЕНЕЗА И АТЕРОГЕНЕЗА У КРЫС ЛИНИИ W1STAR

Исследовано влияние перорального поступления солей железа и меди на проадипогенный эффект высоко-жировой диеты и развитие атерогенных изменений липидного спектра сыворотки крови у экспериментальных животных. Установлено, что употребление Fe^{2+} и Cu^{2+} с питьевой водой в дозах, соответствующих 1 ПДК, потенцирует адипогенный эффект высоко-жировой диеты, что отражается в увеличении как абсолютного, так и относительного содержания жировой ткани. Также выявлено влияние солей металлов с переменной валентностью на атерогенный сдвиг липопротеинового спектра сыворотки у экспериментальных животных.

Ключевые слова: железо, медь, высоко-жировая диета, атерогенез, адипогенез.

В последние десятилетия установлена огромная роль внешних химических факторов в развитии избыточного веса и ожирения [2]. Так, было показано влияние значительного количества органических веществ на интенсивность адипогенеза, как в эксперименте на животных, так и в человеческой популяции. При этом подобное влияние неорганических соединений изучено в значительно меньшей степени. Стоит также отметить, что наряду с ожирением, химическое воздействие на организм способствует развитию и других компонентов метаболического синдрома, таких как артериальная гипертензия, инсулинорезистентность с последующим сахарным диабетом и атеросклероз [7].

Учитывая широкое распространение соединений железа и меди в окружающей среде и их роль в активации свободно-радикального окисления [6], изучение проадипогенного действия данных металлов, безусловно, представляет значительный интерес. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось определение влияния перорального поступления солей железа и меди на проадипогенный эффект высоко-жировой диеты и развитие атерогенных изменений липидного спектра сыворотки крови у экспериментальных животных.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 48 крысах-самках линии Wistar в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных». Проведение работы было одобрено Локальным этическим комитетом. Животные содержались в лаборатории в условиях искусственного освещения (12-часовой световой

день) и кормления ad libitum. В течение недели до начала эксперимента животные находились на карантине в условиях лаборатории.

В качестве стандартной диеты использовался комбикорм (ЗАО «Оренбургский комбикормовый завод»). В качестве диеты с высоким содержанием жира использовалась стандартная диета с добавлением свиного сала. Увеличение содержания жиров в диете осуществлялось последовательно. В течение 1 месяца эксперимента диета содержала 21,7% жиров, 17,4% белков и 60,9% углеводов в пересчете на калории. В течение 2 месяца эксперимента содержание жиров, белков и углеводов в пересчете на ккал составляло 31,6%, 15,2% и 53,2 соответственно. Диета, на которой содержались животные в течение 3 месяца в пересчете на ккал содержала 40,1% жиров, 13,3% белков и 46,6% углеводов. Все животные были разделены на 8 групп, по 6 крыс в каждой. Животные всех групп, за исключением контрольных, в течение 3-х месяцев получали с питьевой водой соли Fe^{2+} и Cu^{2+} . Крысы I группы (контроль I) получали питьевую воду высшей категории с общей минерализацией <250 мг/л, V группа животных служила внутренним контролем для животных, находящихся на диете с высоким содержанием жира. Животные этой группы также получали чистую питьевую воду на фоне потребления высоко-жировой диеты. II и VI группы животных содержались на стандартной диете и диете с высоким содержанием жира, соответственно, на фоне потребления 3 мг/л $FeSO_4 \cdot 12H_2O$ с питьевой водой. III и VII группы животных, находящиеся на стандартной и высоко-жировой диетах, соответственно, получали с питьевой

водой 4,88 мг/л CuSO_4 . В свою очередь животные, находящиеся на стандартной и высокожировой диетах, получающие комбинацию используемых солей Fe^{2+} и Cu^{2+} в концентрациях 1,5 и 2,44 мг/л, соответственно, относились к IV и VIII группам. С целью моделирования реальных условий водопотребления, крысы имели неограниченный доступ к питьевой воде. Контроль над количеством потребленной воды производился ежедневно посредством градуированной посуды. Ежедневно проводилось контрольное взвешивание животных.

По окончании производилось измерение морфометрических параметров животных. Длина тела (от носа до анального отверстия), а также вес тела использовались для расчета индекса массы тела (ИМТ). Также измерялась окружность грудной клетки (непосредственно позади передних конечностей), а также окружность живота (непосредственно перед задними конечностями). Полученные данные использовались для определения соотношения ОЖ/ОГ, являющегося одним из критериев абдоминального ожирения. После измерения морфометрических показателей производилось вскрытие путем срединной лапаротомии. Из доступа производилось выделение параметриальной и параовариальной жировой клетчатки. Полученные жировые подушки взвешивались и использовались для дальнейших анализов. На основании веса жировой подушки было рассчитано процентное содержание жировой ткани от общей массы тела.

Оценка содержания железа и меди в организме, как критерий их поступления с водой, производилась на основании определения концентрации металлов в шерсти. Определение концентрации Fe и Cu в шерсти животных производилось методом атомно-эмиссионной спектрометрии.

В сыворотке крови экспериментальных животных с использованием набора реагентов фирмы Roche на биохимическом анализаторе Cobas Integra определялось содержание общего холестерина (ХС), триацилглицеридов (ТАГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Определение апопротеинов A₁ и B (апоA₁, апоB) проводилось иммуно-турбидиметрическим методом по реакции преципитации со специфической антисывороткой на биохимическом анализаторе «COBAS Integra» 400 plus. С целью определения влияния исследуемых

факторов на углеводный обмен производилась оценка концентрации глюкозы в сыворотке крови с помощью набора реактивов Roche на биохимическом анализаторе COBAS Integra.

Статистический анализ данных осуществлялся с помощью программного пакета Statistika 10 for Windows. Данные представлены в виде среднего значения с указанием ошибки средней. По групповое сравнение значений производилось с помощью модуля ANOVA. Выявление достоверных различий между группами осуществлялось методом апостериорного сравнения с использованием критерия наименьшей значимости (Fisher LSD-test).

Результаты

В ходе исследования установлено, что хроническое употребление солей железа и меди приводило к повышению веса у экспериментальных животных (Таблица 1). Наиболее выраженные изменения морфометрических параметров отмечались в группах животных, получавших с питьевой водой 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (VI), а также комбинации 1,5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 2,44 мг/л CuSO_4 (VIII) на фоне высокожировой диеты. Так, значения общего прироста веса животных в VI и VIII группах достоверно превышали соответствующие значения контрольной группы животных, содержащихся на высокожировой диете на 25 и 44% соответственно. Средние значения окружности живота, соотношения ОЖ/ОГ в данных группах (VI и VIII), также характеризовались достоверным увеличением относительно контрольных значений. В то же время, ИМТ экспериментальных животных достоверно не изменялся, хотя и имел тенденцию к повышению. Масса параметрия в VI и VIII группах животных превышала контрольные значения (V группа) на 33 и 25% соответственно. Процентное содержание жировой подушки от общей массы тела также было достоверно выше в этих группах. Стоит отметить, что в группе животных, получающих смесь 1,5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 2,44 мг/л CuSO_4 на фоне стандартной диеты (IV), отмечалось достоверное увеличение окружности живота и соотношения ОЖ/ОГ на 7% от контрольных значений (I группа) соответственно.

В таблице 2 представлены данные, отражающие содержание исследуемых металлов в шерсти экспериментальных животных.

Хроническое поступление 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ с питьевой водой как у крыс, находящихся на стандартной диете (II), так и на диете с высоким содержанием жира (VI), приводило к достоверному увеличению содержания железа в шерсти на 30 и 36% относительно соответствующих контрольных групп. В то же время стоит отметить, что в шерсти животных, получающих железо (II и VI группы), отмечалась тенденция к увеличению концентрации меди в шерсти на 6 и 8% соответственно. Употребление питьевой воды, содержащей CuSO_4 в концентрации 4,88 мг/л, приводило к достоверному увеличению содержания меди в шерсти экспериментальных животных получавших стандартную (III) и высоко-жировую диету (VII) на 12 и 14% относительно контрольных групп (I и V) соответственно. В группах животных, получающих медь на фоне стандартной (III) и высоко-жировой диеты (VII), было

отмечено существенное, хотя и недостоверное повышение содержания железа в шерсти на 13 и 20% относительно соответствующих контролей (I и V). Употребление питьевой воды, содержащей 1,5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 4,88 мг/л CuSO_4 , крысами, находящимися на обеих диетах (IV и VIII), приводило к незначительному, но достоверному увеличению содержания железа в шерсти животных на 8 и 7% от контрольных групп (I и V). В то же время увеличение содержания меди в шерсти в данных группах не являлось достоверным.

Из, данных, представленных в таблице 3 видно, что употребление с питьевой водой солей железа и меди не вызывало выраженных изменений таких сывороточных показателей липидного обмена как ХС, ЛПВП и ЛПНП. В то же время, стоит отметить, что в большей степени данные показатели изменялись у экспериментальных животных, находящихся на

Таблица 1. Морфометрические показатели экспериментальных животных

№	Группа	ОЖ/ОГ	ИМТ	Жир. подушка (г)	% жира от общ. веса
I	СтД	1,13±0,02	0,68±0,02	7,58±1,08	2,57±0,34
II	Fe•СтД	1,14±0,02	0,69±0,02	8,48±0,90	2,78±0,28
III	Cu•СтД	1,17±0,02	0,71±0,03	7,64±1,64	2,56±0,47
IV	Fe/Cu•СтД	1,21±0,01*	0,69±0,03	7,65±0,61	2,59±0,15
V	ВЖД	1,17±0,01	0,76±0,04	11,84±1,09	3,87±0,37
VI	Fe•ВЖД	1,22±0,03†	0,76±0,05	15,74±2,22†	4,81±0,60†
VII	Cu•ВЖД	1,18±0,03	0,75±0,04	11,86±1,03	3,80±0,28
VIII	Fe/Cu•ВЖД	1,20±0,01†	0,79±0,05	14,88±1,76†	4,30±0,50†

* - достоверность отличия от СтД-контроля (p<0,05)
† - достоверность отличия от ВЖД-контроля (p<0,05)

Таблица 2. Содержание железа и меди в шерсти экспериментальных животных

		Fe (µг/г)	Cu (µг/г)
I	СтД	20,040±0,399	13,318±0,678
II	Fe•СтД	26,180±2,754*	14,206±0,234
III	Cu•СтД	22,660±1,838	14,884±0,328*
IV	Fe/Cu•СтД	21,574±0,465*	14,286±0,407
V	ВЖД	20,240±2,160	13,178±0,344
VI	Fe•ВЖД	27,640±1,175*	14,290±0,563
VII	Cu•ВЖД	24,033±2,522	15,010±0,251*†
VIII	Fe/Cu•ВЖД	21,472±0,649*	13,463±0,149

* - достоверность отличия от СтД-контроля (p<0,05)
† - достоверность отличия от ВЖД-контроля (p<0,05)

стандартной диете на фоне употребления солей исследуемых металлов. Так, у крыс, получающих с питьевой водой 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ отмечалось достоверное увеличение концентрации ЛПНП в сыворотке крови на 62%, ЛПВП – на 10%; ХС – на 22%. У животных, получающих 4,88 мг/л CuSO_4 , а также комбинацию 1,5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 2,44 мг/л CuSO_4 , на фоне стандартной диеты также наблюдалась тенденция к увеличению ХС и ЛПНП, тем не менее, наблюдаемые изменения не были достоверными. В то же время, у экспериментальных животных, получающих соли металлов с питьевой водой на фоне высоко-жировой диеты (VI, VII, VIII группы) сколько-нибудь значимых изменений в концентрации ХС, ЛПНП и ЛПВП выявлено не было. Концентрация ТАГ в сыворотке экспериментальных животных, получающих с питьевой водой соли железа и меди, имела тенденцию к повышению. В то же время, среди животных, находящихся на стандартной диете досто-

верно наибольшая концентрация ТАГ отмечалась в группе, получающей с питьевой водой 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, превышая контрольные значения на 41%. Употребление с питьевой водой 1,5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 2,44 мг/л CuSO_4 , на фоне стандартной и высоко-жировой диеты приводило к увеличению концентрации ТАГ в сыворотке на 36 и 25% от соответствующих контрольных значений (I и V).

В таблице 4 приведены данные по содержанию АпоА₁ и АпоВ в сыворотке крови экспериментальных животных. Следует отметить, что наиболее выраженные изменения как общей концентрации АпоА₁ и АпоВ, так и апопротеинового индекса (соотношение АпоА₁/АпоВ) под влиянием исследуемых металлов наблюдались у животных, находящихся на стандартной диете. Так у животных II, III, IV экспериментальных групп отмечалось более чем 2-х кратное снижение концентрации АпоА₁. При этом наименьшие значения

Таблица 3. Липопротеиновый спектр сыворотки крови экспериментальных крыс Wistar

№	Группа	ХС (ммоль/л)	ЛПВП (мкмоль/л)	ЛПНП (мкмоль/л)	ТАГ (ммоль/л)
I	СтД	1,498±0,215	1,228±0,081	0,138±0,024	0,963±0,166
II	Fe•СтД	1,832±0,235	1,354±0,102	0,224±0,023*	1,366±0,070*
III	Cu•СтД	1,550±0,220	1,232±0,156	0,203±0,055	0,912±0,041
IV	Fe/Cu•СтД	1,622±0,144	1,294±0,122	0,203±0,042	1,312±0,264
V	ВЖД	1,673±0,193	1,273±0,064	0,158±0,053	1,207±0,396
VI	Fe•ВЖД	1,720±0,217	1,312±0,093	0,180±0,041	1,470±0,384
VII	Cu•ВЖД	1,676±0,122	1,170±0,104	0,140±0,018	1,378±0,247
VIII	Fe/Cu•ВЖД	1,542±0,053	1,274±0,038	0,118±0,035	1,510±0,208*

* - достоверность отличия от СтД-контроля (p<0,05)
† - достоверность отличия от ВЖД-контроля (p<0,05)

Таблица 4. Аполипопротеиновый спектр сыворотки крови крыс Wistar

№	Группа	АпоВ (г/л)	АпоА ₁ (г/л)	АпоА ₁ /АпоВ
I	СтД	0,022±0,004	0,030±0,004	1,167±0,186
II	Fe•СтД	0,032±0,005	0,014±0,002*	0,460±0,040*
III	Cu•СтД	0,025±0,002	0,015±0,002*	0,625±0,122*
IV	Fe/Cu•СтД	0,034±0,009	0,012±0,002*	0,440±0,154*
V	ВЖД	0,023±0,003	0,010±0,001*	0,450±0,050*
VI	Fe•ВЖД	0,028±0,008	0,010±0,001*	0,425±0,067*
VII	Cu•ВЖД	0,030±0,006	0,015±0,002*†	0,550±0,109*
VIII	Fe/Cu•ВЖД	0,045±0,011*†	0,018±0,004†	0,400±0,052*

* - достоверность отличия от СтД-контроля (p<0,05)
† - достоверность отличия от ВЖД-контроля (p<0,05)

соотношения АпоА₁/АпоВ отмечались у животных, получающих с питьевой водой 3 мг/л FeSO₄·12H₂O, а также 1,5 мг/л FeSO₄·12H₂O и 2,44 мг/л CuSO₄, на фоне стандартной диеты, составляя 39 и 38% от контрольных показателей (I группа). Как и в случае холестерина липопротеиновых частиц, показатели АпоА₁ и АпоВ среди животных, находящихся на высоко-жировой диете, в меньшей степени отличались от контрольных значений (V). Так среди животных, находящихся на высоко-жировой диете, наибольшие изменения концентрации апобелков в сыворотке отмечались в группе, получающей с питьевой водой оба металла (1,5 мг/л FeSO₄·12H₂O и 2,44 мг/л CuSO₄), достигая, практически двукратного увеличения сывороточной концентрации АпоВ. Тем не менее, за счет сопутствующего увеличения АпоА₁ на 80% от контрольных значений (V), соотношение АпоА₁/АпоВ, являющееся интегральным показателем, не имело существенных отличий от контроля (V).

Обсуждение

Полученные данные позволяют сделать заключение, что хроническое поступление железа и меди с питьевой водой в пределах ПДК приводило к повышению веса экспериментальных животных. В то же время, наиболее выраженное проадипогенное действие металлов наблюдалось на фоне потребления диеты с высоким содержанием жира. Важно отметить, что наиболее выраженным адипогенным действием обладала комбинация солей железа и меди на фоне высоко-жировой диеты. При моногенном действии исследуемых металлов, наиболее выраженный адипогенный эффект характерен для солей железа. Медь, в свою очередь, потенцировала данное действие железа, самостоятельно не оказывая значительного влияния, как на прирост массы тела, так и содержание жировой ткани. Следует обратить внимание на то, что несмотря на отсутствие достоверных изменений в приросте веса и жировой ткани у животных при употреблении солей железа и меди на фоне стандартной диеты, в группе Fe•СтД отмечалась тенденция к увеличению данных показателей. Подобная ситуация скорее всего свидетельствует об иницирующем влиянии металлов на развитие ожирения, которое усиливается на фоне потребления высококалорийной высокожировой диеты.

В ходе исследования было установлено, что употребление питьевой воды с повышенным содержанием соли железа и меди в различных концентрациях и их комбинации приводит к кумуляции металлов в организме, носящий дозозависимый характер. В то же время, наблюдается отсутствие выраженной кумуляции железа в шерсти животных на фоне употребления комбинации исследуемых металлов с питьевой водой.

Заслуживающим внимания является факт о более выраженном дислипидопротеинемическом эффекте в случае перорального приема солей металлов на фоне стандартной диеты по сравнению с высоко-жировой. Возможным механизмом подобного эффекта может являться активация свободно-радикального окисления как в организме в целом, так и в печени, играющей важнейшую роль в метаболизме липидов и липидтранспортных частиц. Так, активация перекисного окисления в гепатоцитах сопровождается угнетением ключевого фермента окисления ХС до желчных кислот 7 β -холестеролгидроксилазы, что приводит к снижению скорости катаболизма холестерина до желчных кислот [1], с последующим развитием дислипидопротеинемий. Более того, железо также может приводить к угнетению активности ферментных систем эндотелия сосудов, в частности липопротеинлипазы, что также может приводить к атерогенным сдвигам липопротеинового спектра, а также гипертриацилглицеридемии [3]. Наряду с металл-индуцированной активацией свободно-радикального окисления, также необходимо учитывать возможность непосредственного влияния как Fe²⁺, так и Cu²⁺ на ключевой фермент метаболического пути биосинтеза ХС – оксиметилглутарил-КоА-редуктазу [4], [5], что приводит к повышению его внутриклеточного пула. Можно предположить, что отсутствие выраженного изменения липопротеинового спектра сыворотки крови у животных, содержащихся на ВЖД, обусловлено антиатерогенными свойствами свиного сала, используемого для моделирования ожирения в данном случае. В то же время, изменение спектра аполипидопротеинов по атерогенному типу у лабораторных животных, получающих с питьевой водой соли железа и меди на фоне ВЖД, свидетельствует об индукции атерогенеза металлами с переменной валентностью.

Заключение

Таким образом, настоящее исследование показало, что экологически-релевантные дозы солей железа и меди при их поступлении с пи-

тывой водой активируют процессы адипогенеза и атерогенеза в организме экспериментальных животных.

28.10.2013

Работа поддержана грантом Правительства Оренбургской области 2013 г.

Список литературы:

1. Меерсон Ф.З., Твердохлеб В.П., Никоноров А.А. и др. Роль подавления активности 7- β -гидроксилазы холестерина печени в возникновении стрессовой дислипотеидемии // Кардиология, 1988, №9, с. 85-87.
2. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. J. Altern. Complement. Med. 2002; 8: 185-192
3. Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, Weiss G. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. J Am Coll Cardiol. 2002; 40(12):2189-94.
4. Graham RM, Chua AC, Carter KW, Delima RD, Johnstone D, Herbison CE, Firth MJ, O'Leary R, Milward EA, Olynyk JK, Trinder D. Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. Hepatology, 2010; 52(2):462-71.
5. Ohguchi S, Ichimiya H, Yagi A, Hayashi H, Sakamoto N. Copper-induced hypercholesterolemia of golden hamsters: enhanced synthesis of cholesterol in the liver. Gastroenterol Jpn. 1988; 23(6):629-32.
6. Valko M, Morris H, Kronin MTD: Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem. 2005; 12(10):1161-1208
7. Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. Ann Med. 2003; 35(8):578-91.

Сведения об авторах:

Тиньков Алексей Алексеевич, аспирант кафедры биологической химии
Оренбургской государственной медицинской академии, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Никоноров Александр Александрович, заведующий кафедрой биохимии
Оренбургской государственной медицинской академии, доктор медицинских наук, профессор,
e-mail: nikonorov_all@mail.ru
460014, г. Оренбург, ул. Советская, 6

UDC 577.1

Tinkov A.A., Nikonorov A.A.

Orenburg state medical academy, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

INFLUENCE OF IRON AND COPPER CONSUMPTION ON ADIPOGENESIS AND ATHEROGENESIS INITIATION IN WISTAR RATS

The aim of the current study was investigation of the iron and copper consumption of the adipogenic effect of the high-fat diet and development of atherogenic changes of the lipoprotein profile in Wistar rats. It has been shown that Fe²⁺ and Cu²⁺ consumption potentiates the adipogenic effect of the high-fat diet as assessed by absolute and relative adipose tissue content in the rats' organism. It has been estimated that ecologically-relevant doses of iron and copper induce atherogenic changes in the serum lipoprotein spectra in the experimental animals.

Key words: iron, copper, high-fat diet, atherogenesis, adipogenesis.

Bibliography:

1. Meerson F.Z., Tverdokhlib V.P., Nikonorov A.A., Filippov V.K., Frolov B.A. The role of suppression of cholesterol 7-hydroxylase activity of the liver in the development of atherogenic stress-induced dyslipoproteinemia. Kardiologiya. 1988;28(9):85-87.
2. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. J. Altern. Complement. Med. 2002; 8: 185-192
3. Gaenger H., Marschang P., Sturm W., Neumayr G., Vogel W., Patsch J., Weiss G. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. J Am Coll Cardiol. 2002; 40(12):2189-94.
4. Graham R.M., Chua A.C., Carter K.W., Delima R.D., Johnstone D., Herbison C.E., Firth M.J., O'Leary R., Milward E.A., Olynyk J.K., Trinder D. Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. Hepatology, 2010; 52(2):462-71.
5. Ohguchi S., Ichimiya H., Yagi A., Hayashi H., Sakamoto N. Copper-induced hypercholesterolemia of golden hamsters: enhanced synthesis of cholesterol in the liver. Gastroenterol Jpn. 1988; 23(6):629-32.
6. Valko M., Morris H., Kronin MTD: Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem. 2005; 12(10):1161-1208
7. Yuan X.M., Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. Ann Med. 2003; 35(8):578-91.