



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ**  
**ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ**  
**ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ**

**ΒΛΑΧΟΥ ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ**  
**ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ**  
**ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ**

**ΒΛΑΧΟΥ ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ Βλάχου Χαρίκλειας: 9-10-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 595<sup>α</sup>/21-11-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-12-2006

«Διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και της ομοιοστασίας του σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 711<sup>α</sup>/3-5-2011

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	τ. Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας -Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαϊρακτάρη Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κορατζόπουλος Παναγιώτης	Λέκτορας Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-5-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΕΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



*Αφιερωμένο σε όσους  
ήταν κοντά μου ...*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πολλοί λένε ότι κάθε μεγάλο ταξίδι ξεκινά με ένα μικρό βήμα στην αρχή. Το βήμα αυτό το έκανα πριν περίπου πέντε χρόνια όταν ξεκίνησα την παρούσα εργασία στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Από εκείνη τη στιγμή μέχρι και σήμερα, το ταξίδι αυτό μου επιφύλασσε αρκετές δυσκολίες και προκλήσεις. Ωστόσο, χάρη στη συμβολή ορισμένων ανθρώπων η διαδρομή του ταξιδιού αναδείχθηκε σε μια πολύτιμη εμπειρία, την οποία θα θυμάμαι για το υπόλοιπο της ζωής μου. Οι παρακάτω γραμμές αποτελούν μια απλή ευχαριστήρια αναφορά σε αυτούς τους ανθρώπους.

Άμεσος επιβλέπων της εργασίας ήταν ο Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία που αναπτύξαμε αυτά τα πέντε χρόνια. Υπήρξε πολύτιμος σύμβουλος και αρωγός, παρέχοντας μου όλα εκείνα τα απαραίτητα εφόδια και γνώσεις που οδήγησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Αιματολογίας κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Θεόδωρο Τζαβάρα, μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για το ενδιαφέρον που έδειξαν κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής και τις πολύ εύστοχες παρατηρήσεις τους κατά τη συγγραφή της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους αγαπητούς συναδέλφους δρ. Χρήστο Αμοργιανιώτη, δρ. Μαρία Μελίδου και δρ. Κατερίνα Γεωργοπούλου, για τη φιλία, τη συμπαράσταση τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στη Λέκτορα Ανατομίας-Ιστολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη για την απεριόριστη συμπαράστασή της και την πολύτιμη φιλία της. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον κ. Περικλή Πούλια για την κατανόηση και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, με την ευκαιρία αυτού του προλόγου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και ιδιαίτερα την αδερφή μου Γεωργία για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν καθώς και για τη διαρκή ενθάρρυνση χωρίς την οποία δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

### ΕΙΚΟΝΕΣ

### ΠΙΝΑΚΕΣ

### ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	
1.1. Βιολογική σημασία του σιδήρου.....	1
1.2. Τοξικότητα του σιδήρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	3
1.2.1. Ελεύθερες ρίζες.....	4
1.2.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.....	5
1.2.3. Οξειδωτικό στρες.....	8
1.2.4 Βλαπτικές επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών σε κυτταρικά συστατικά...9	
1.3. Ομοιοστασία του σιδήρου.....	10
1.3.1. Απορρόφηση του σιδήρου.....	10
1.3.2. Κατανομή και ανακύκλωση του σιδήρου στον οργανισμό.....	13
1.3.3. Ο ρόλος της ηπατιδίνης.....	16
1.3.4. Παρουσία του σιδήρου στον ορό του αίματος: ο ρόλος της τρανσφερρίνης.....	20
1.3.5. Πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα.....	22
1.4. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (Labile Iron Pool, LIP).....	25
1.4.1. Ρύθμιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου εντός των κυττάρων: σύστημα IRP-IRE.....	26
1.5. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και διατροφή.....	30
1.6. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και γήρανση.....	31
1.7. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και παθολογικές καταστάσεις .....	33
1.7.1. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και Αναιμία Χρονίας Νόσου.....	33
1.7.2. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και Χρόνια Καρδιακή Ανεπάρκεια.....	38

1.8. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες και του σιδήρου στον οργανισμό.....	41
1.8.1. Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες.....	41
1.8.2. Δείκτες εκτίμησης των επιπέδων του σιδήρου στον οργανισμό.....	42
1.8.3. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP).....	43
1.9. Σκοπός της μελέτης.....	47

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....**

### **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1. Υλικά.....	48
2.2. Καλλιέργειες κυττάρων .....	50
2.2.1. Διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	50
2.2.2. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	51
2.2.3. Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.....	52
2.3. Δείγματα ατόμων.....	52
2.4. Μέθοδοι.....	55
2.4.1. Μέτρηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP).....	55
2.4.2. Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay)...	56
2.4.3. Ανάλυση των διαφόρων μορφών της τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-UPAGE).....	58
2.4.4. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.....	61
2.4.5. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση ερυθροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	61
2.4.6. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.....	62
2.4.7. Ανάλυση κυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.....	62
2.4.8. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.....	64

2.4.9. Στατιστική ανάλυση.....	65
--------------------------------	----

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **Μέρος Α**

3.1. Χρήση σιδηροδεσμευτικών ενώσεων για την κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου.....	66
3.1.1. Ενδοκυττάρια δέσμευση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου.....	67
3.1.2. Προστασία του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	71
3.1.3. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη.....	73
3.1.4. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού.....	80

#### **Μέρος Β**

3.2. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος.....	84
3.2.1. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος.....	85
3.2.2. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στα ερυθροκύτταρα.....	89
3.2.3. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στα δικτυοερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος.....	90

#### **Μέρος Γ**

3.3. Θετική συσχέτιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με την ηλικία .....	93
3.4. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια.....	96

### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

4.1. Κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου από εξειδικευμένες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις.....	100
---	-----

4.2. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος.....	103
4.3. Ο ρόλος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στη γήρανση.....	106
4.4. Ο ρόλος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στη Χρόνια Καρδιακή Ανεπάρκεια.....	107
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>110</b>
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>112</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>115</b>
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>117</b>

## **EΙΚΟΝΕΣ**

**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.

**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας οξειδωτικού στρες.

**Εικόνα 3.** Απεικόνιση των επιδράσεων του σταδιακά αυξανόμενου οξειδωτικού στρες σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

**Εικόνα 4.** Τροποποιήσεις βασικών συστατικών του κυττάρου (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA, υδατάνθρακες) μετά την οξείδωσή τους από ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου.

**Εικόνα 5.** Απορρόφηση του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα.

**Εικόνα 6.** Κατανομή του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό.

**Εικόνα 7.** Ανακύκλωση του σιδήρου από τα μακροφάγα.

**Εικόνα 8.** Αλληλουχία του ώριμου πεπτιδίου της ηπατιδίνης του ανθρώπου.

**Εικόνα 9.** Η πρόσδεση της ηπατιδίνης στη φερροπορτίνη αναστέλλει την έξοδο του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα και τα μακροφάγα.

**Εικόνα 10.** Μοντέλο ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου σε επίπεδο οργανισμού.

**Εικόνα 11.** Δομή της τρανσφερρίνης.

**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων.

**Εικόνα 13.** Στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο (Iron Responsive Elements, IREs) στο 5' και 3' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής του mRNA της φερριτίνης και του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1, αντίστοιχα.

**Εικόνα 14.** Ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο μέσω του συστήματος αλληλεπίδρασης IRP-IRE σε συνθήκες ένδειας και περίσσειας σιδήρου.

**Εικόνα 15.** Ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην ομοιοστασία του σιδήρου μέσω του συστήματος αλληλεπίδρασης IRP-IRE.

**Εικόνα 16.** Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών οξειδωσης που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της γήρανσης και η πιθανή εμπλοκή του σιδήρου σε αυτές.

**Εικόνα 17.** Η αλληλεπίδραση ηπατιδίνης-φερροπορτίνης (Hepcidin-Fpn) καθορίζει τη διαθεσιμότητα του σιδήρου στον ορό του αίματος ασθενών AXN.

**Εικόνα 18.** Δομή των χημικών ενώσεων δεσφεριοξαμίνη (Α), δεφεριπρόνη (Β) και δεφερασιρόξη (Γ).

**Εικόνα 19.** Σχηματική αναπαράσταση των δεικτών που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό.

**Εικόνα 20.** Δομή της καλσεΐνης.

**Εικόνα 21.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στο εσωτερικό ανέπαφων κυττάρων φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της καλσεΐνης.

**Εικόνα 22.** Καταγραφή των διαφόρων σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής του «comet assay» (Α) και μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις (Β).

**Εικόνα 23.** Αναπαράσταση του υδροδυναμικού συστήματος ροής και του οπτικού συστήματος ενός κυτταρομετρητή ροής.

**Εικόνα 24.** Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών βημάτων μιας υποθετικής σιδηροδεσμευτικής ένωσης με δυνατότητα κινητοποίησης του σιδήρου από το εσωτερικό των κυττάρων προς την τρανσφερρίνη του εξωκυττάρου χώρου.

**Εικόνα 25.** Ενδοκυττάρια δέσμευση του σιδήρου από τις ενώσεις δεσφεριοξαμίνη, δεφεριπρόνη, δεφερασιρόξη και καφεϊκό οξύ.

**Εικόνα 26.** Υπολογισμός τιμών EC50 της δεσφεριοξαμίνης, της δεφεριπρόνης, της δεφερασιρόξης και του καφεϊκού οξέος.

**Εικόνα 27.** Προστατευτική δράση των ενώσεων δεσφεριοξαμίνη, δεφεριπρόνη, δεφερασιρόξη και καφεϊκό οξύ ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο κυτταρικό DNA.

**Εικόνα 28.** Διαχωρισμός των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE).

**Εικόνα 29.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφεριπρόνης.

**Εικόνα 30.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφερασιρόξης.

**Εικόνα 31.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία καφεϊκού οξέος.

**Εικόνα 32.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφεριπρόνης και δεσφεριοξαμίνης.

**Εικόνα 33.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία καφεϊκού οξέος και δεσφεριοξαμίνης.

**Εικόνα 34.** Αύξηση του κορεσμού τρανσφερρίνης ορού μετά την προσθήκη διαλύματος τρισθενούς σιδήρου.

**Εικόνα 35.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού παρουσία δεφεριπρόνης.

**Εικόνα 36.** Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού παρουσία δεφεριπρόνης και δεσφεριοξαμίνης.

**Εικόνα 37.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.

**Εικόνα 38.** Διατήρηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP).

**Εικόνα 39.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στα ερυθροκύτταρα με κυτταρομετρία ροής.

**Εικόνα 40.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε δικτυοερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής.

**Εικόνα 41.** Αύξηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε σχέση με την ηλικία.



## **ΠΙΝΑΚΕΣ**

**Πίνακας 1.** Αντιπροσωπευτικές «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου».

**Πίνακας 2.** Λειτουργική ταξινόμηση καρδιακής ανεπάρκειας κατά NYHA (New York Association).

**Πίνακας 3.** Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το σίδηρο σε υγιείς δότες.

**Πίνακας 4.** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

**Πίνακας 5.** Εργαστηριακές παράμετροι των ασθενών.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**ACE-I:** Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors

**APS:** ammonium persulfate, υπερ-θεικό αμμώνιο

**ARB:** Angiotensin Receptor Blockers

**AXN:** Αναιμίες Χρονίας Νόσου

**CA-AM:** Calcein-acetomethoxy ester

**CAT:** Catalase

**CDC14A:** Dual specificity protein

**CRP:** C-Reactive protein

**Dcytb:** Duodenal cytochrome b

**DFO:** Desferioxamine

**DFP:** Deferiprone

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMT1:** Divalent Metal Transporter

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide

**EALAS:** erythroid 5-aminolevulinate synthase

**EDTA:** Ethylenetriaminetetraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ

**EJ:** Ejection Fraction

**ESA:** Erythropoiesis Stimulating Agents

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**FPN:** Ferroportin

**GP:** Glutathione Peroxidase

**HAMP:** Hepcidin Antimicrobial Peptide

**HCP1:** Heme Carrier Protein

**HFE:** Human Hemochromatosis

**HIF-1:** Hypoxia inducible factor

**HO-1:** Heme Oxygenase-1

**HJV:** Hemojuvelin

**ICL-670:** Deferasirox

**IRE:** Iron Responsive Element

**IRP:** Iron Regulating Protein

**LIP:** Labile Iron Pool

**LVEF:** Left Ventricular Ejection Fraction

**MCH:** Mean Corpuscular Hemoglobin

**MCHC:** Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

**MCV:** Mean Corpuscular Volume

**MRI:** Magnetic Resonance Imaging

**NK:** Natural killer cells

**NMR:** Nuclear Magnetic Resonance

**NTBI:** Non transferrin bound iron

**NYHA:** New York Heart Association

**PBS:** Phosphate buffer saline

**Prx:** Peroxiredoxines

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**RVSP:** Right Ventricular Systolic Pressure

**SIH:** Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone

**SOD:** Superoxide Dismutases

**TEMED:** N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-  
τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη

**Tf:** Transferrin

**TfR1:** Transferrin Receptor-1

**TfR2:** Transferrin Receptor-2

**TIBC:** Total Iron Binding Capacity

**UPAGE:** Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Βιολογική σημασία του σιδήρου

Ο σίδηρος αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την εύρυθμη λειτουργία όλων των οργανισμών, καθώς απαντάται στο ενεργό κέντρο ενζύμων που κατέχουν κομβικό ρόλο στη διεκπεραίωση μιας σειράς βασικών βιοχημικών διεργασιών απαραίτητων για τη ζωή, όπως για παράδειγμα η μεταφορά του οξυγόνου, η μεταφορά των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, η σύνθεση του DNA και ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών [Aisen et al., 2001]. Η βιολογική δράση του σιδήρου είναι απόρροια της χημικής του ικανότητας, ως στοιχείο μετάπτωσης, να λειτουργεί ταυτόχρονα ως δέκτης και δότης ηλεκτρονίων, μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό την οξειδοαναγωγική του κατάσταση κυρίως μεταξύ της δισθενούς ( $\text{Fe}^{2+}$ ) και της τρισθενούς μορφής ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (οξειδοαναγωγικό δυναμικό: +772 mV σε ουδέτερο pH). Ωστόσο, έχει τη δυνατότητα κάτω από ορισμένες συνθήκες να εμφανίζει ακόμη τις οξειδωτικές βαθμίδες +4, +5 και +6 [Galaris and Pantopoulos, 2008]. Κάτω από αερόβιες συνθήκες, η βιοδιαθεσιμότητά του γενικά περιορίζεται καθώς η δισθενής μορφή του οξειδώνεται σε τρισθενή στην οποία υπό φυσιολογικές τιμές pH είναι ελάχιστα διαλυτός.

Η σημασία του σιδήρου για τον ανθρώπινο οργανισμό συνίσταται πρωτίστως στην παρουσία του στο μόριο της αίμης. Ο σίδηρος ενσωματώνεται στον τετραπυρρολικό δακτύλιο της πρωτοπορφυρίνης και δίνει γένεση στο μόριο της αίμης, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό ενεργά στη δημιουργία της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης. Η αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς, ενώ η μυοσφαιρίνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων διευκολύνει τη μεταφορά του οξυγόνου σε αυτά. Ακόμη, τα κυτοχρώματα, μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχουν την προσθετική ομάδα της αίμης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση διαφόρων αντιδράσεων, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων στην

αναπνευστική αλυσίδα (κυτοχρώματα a, b και c) και ο μεταβολισμός φαρμακευτικών ουσιών (π.χ. οικογένεια P450 κυτοχρωμάτων). Επιπλέον, το ένζυμο καταλάση αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα υπεροξειδάσης που έχει ως προσθετική ομάδα την αίμη. Η καταλάση απαντάται στα υπεροξυσώματα και χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου ως υπόστρωμα και το μετατρέπει σε νερό και οξυγόνο, προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τις κυτταρικές δομές από τη συσσώρευσή του, που μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη δημιουργία ελεύθερων ριζών στο κύτταρο με καταστροφικές συνέπειες λόγω της μεγάλης δραστηριότητας των ενώσεων αυτών.

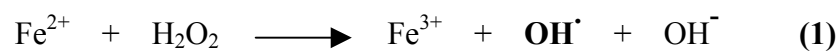
Ουσιώδης είναι η παρουσία του σιδήρου και σε μια ομάδα μεταλλοπρωτεϊνών που δεν περιέχουν αίμη αλλά ιόντα σιδήρου και θείου, όπως 2Fe-2S, 3Fe-4S ή 4Fe-4S [Beinert et al., 1997]. Οι σιδηροθειούχες πρωτεΐνες αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων που κατέχουν λειτουργικούς ρόλους σε διάφορες διεργασίες, όπως στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας (π.χ. πρωτεΐνες Rieske του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας) και στη ρύθμιση της μεταγραφής (π.χ. ο μεταγραφικός παράγοντας SoxR στο βακτήριο *Escherichia coli*). Ακόμη, κομβικής σημασίας είναι και οι πρωτεΐνες που περιέχουν ένα «κέντρο» σιδήρου (mononuclear iron center proteins), το οποίο αποτελείται από ιόντα σιδήρου συνδεδεμένα είτε με ιόντα οξυγόνου είτε με ιόντα αζώτου. Το ένζυμο ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια για τη σύνθεση του DNA, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της ομάδας των πρωτεϊνών που περιέχουν ιόντα σιδήρου συνδεδεμένα με ιόντα οξυγόνου. Επιπλέον, ο σίδηρος φαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό ρύθμισης της ομοιοστασίας του οξυγόνου μέσω της ρύθμισης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα-1 (Hypoxia Inducible Factor-1, HIF-1) [Bruick, 2003]. Η σημασία του συγκεκριμένου παράγοντα έγκειται στο γεγονός ότι ελέγχει τη μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της ερυθροποίησης, της αγγειογένεσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού/επιβίωσης, της γλυκόλυσης καθώς και στην ομοιοστασία του σιδήρου ως απόκριση στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου.

Παράλληλα, είναι γνωστή η συμμετοχή του σιδήρου στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος. Όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, η έλλειψη σιδήρου έχει αποδειχθεί ότι έχει επιπτώσεις στην κυτταρική ανοσία με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων, της ποσότητας των ιντερλευκινών, καθώς και της δραστηριότητας των λεμφοκυττάρων

φυσικών φονέων (natural killer cells, NK cells). Στην περίπτωση του νευρικού συστήματος, η παρουσία του σιδήρου κρίνεται απαραίτητη για τη σωστή εγκεφαλική λειτουργία σε όλες τις ηλικίες [Beard et al., 1993], καθώς εμπλέκεται στη λειτουργία και τη σύνθεση τόσο των νευροδιαβιβαστών όσο και της μυελίνης που περιβάλλει τους νευράξονες.

## 1.2. Τοξικότητα του σιδήρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

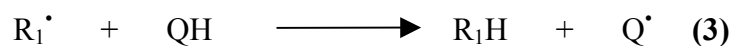
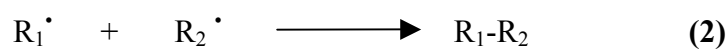
Η ικανότητα του σιδήρου να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση προσλαμβάνοντας ή αποδίδοντας ηλεκτρόνια τον καθιστά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα από τα πιο απαραίτητα στοιχεία για τη ζωή. Ταυτόχρονα όμως, αυτή η ικανότητα είναι υπεύθυνη και για τη συμμετοχή του σιδήρου σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών με τοξικές για το κύτταρο συνέπειες [Galaris and Pantopoulos, 2008]. Για το λόγο αυτό, οι οργανισμοί διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς για τη δέσμευση του σιδήρου προκειμένου να αποφευχθούν οι τοξικές επιπτώσεις του. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, στον ορό του αίματος ο σίδηρος βρίσκεται εξ ολοκλήρου συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη τρανσφερρίνη, ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων αποθηκεύεται κατά κύριο λόγο στη φερριτίνη στη μη οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή  $\text{Fe}^{3+}$ . Ωστόσο, μια μικρή ποσότητα του σιδήρου παραμένει «ελεύθερη» στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι οξειδοαναγωγικά ενεργή. Ο σίδηρος αυτός δύναται να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Fenton (αντίδραση 1) που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου.



Η αντίδραση Fenton αν και μπορεί να καταλυθεί και από άλλα μέταλλα, όπως είναι ο χαλκός, έχει ως κυριότερο καταλύτη της το σίδηρο λόγω της μεγάλης βιοδιαθεσιμότητάς του στα βιολογικά συστήματα [Mello-Filho and Meneghini, 1984; Barbouti et al., 2001].

### 1.2.1. Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο το οποίο έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες των οποίων οι εξωτερικές στιβάδες καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin). Ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, είτε κατά την ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όπου τα ηλεκτρόνια τα οποία αποτελούσαν πριν το δεσμό μοιράζονται από ένα σε κάθε ομάδα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο ελεύθερων ριζών. Συνήθως ο συμβολισμός των ελεύθερων ριζών γίνεται με μια άνω τελεία (δεξιά ή αριστερά) στο χημικό τύπο του ατόμου ή του μορίου, η οποία υποδηλώνει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες ταξινομούνται με βάση το χημικό στοιχείο που έχει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα. Για παράδειγμα, αν η εξωτερική στιβάδα μιας ελεύθερης ρίζας ανήκει στο οξυγόνο, τότε η ελεύθερη ρίζα αναφέρεται ως ελεύθερη ρίζα οξυγόνου. Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες γενικότερα και η ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου ειδικότερα είναι εξαιρετικά δραστικές λόγω της τάσης των ασύζευκτων ηλεκτρονίων της εξωτερικής τους στιβάδας να αποσπών ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ώστε να συμπληρώσουν την ηλεκτρονιακή τους δομή και να εξασφαλίσουν τη σταθερότητά τους. Για το λόγο αυτό, ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι πολύ σύντομος. Συγκεκριμένα, για τις ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες αποτελούν ένα από τα πιο δραστικά μόρια, ο χρόνος αυτός είναι μικρότερος από  $10^{-9}$  δευτερόλεπτα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την άμεση αντίδρασή τους με οτιδήποτε βρεθεί κοντά τους τη στιγμή του σχηματισμού τους. Ωστόσο, η αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα μόριο μη-ελεύθερης ρίζας οδηγεί στη δημιουργία μιας νέας ελεύθερης ρίζας, η οποία αντιδρά περαιτέρω με άλλα μόρια και σχηματίζει νέες ελεύθερες ρίζες προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις. Ανεξέλεγκτη παραγωγή ελεύθερων ριζών μέσα σε ένα κύτταρο μπορεί να καταλήξει σε καταστροφή ολόκληρου του βιολογικού υλικού. Ο τερματισμός των αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών μπορεί να επιτευχθεί με μία από τις παρακάτω αντιδράσεις.





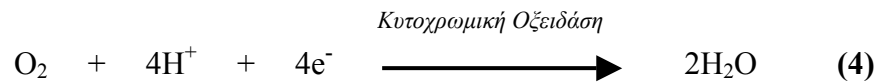
Σύμφωνα με την αντίδραση 2, δύο ελεύθερες ρίζες  $R_1\cdot$  και  $R_2\cdot$  αντιδρούν μεταξύ τους και, συνεισφέροντας ένα ηλεκτρόνιο η καθεμιά, σχηματίζουν έναν ομοιοπολικό δεσμό. Όμως, οι αντιδράσεις αυτές είναι σπάνιες, διότι εξαιτίας της δραστηρότητάς τους οι συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών είναι πολύ χαμηλές και κατά συνέπεια είναι σχεδόν απίθανο να συναντηθούν και να αντιδράσουν μεταξύ τους. Κατά συνέπεια, είναι πιο πιθανό να πραγματοποιηθεί η αντίδραση 3, σύμφωνα με την οποία η ελεύθερη ρίζα  $R_1\cdot$  αντιδρά με ένα άλλο μόριο QH και αποσπώντας ένα άτομο H (ένα πρωτόνιο  $H^+$  και ένα ηλεκτρόνιο  $e^-$  ταυτόχρονα) συμπληρώνει την εξωτερική της στιβάδα ( $R_1H$ ) σχηματίζοντας μια νέα ελεύθερη ρίζα ( $Q\cdot$ ). Σε αυτή την περίπτωση όμως η ελεύθερη ρίζα της ένωσης Q κατ' εξαίρεση δεν είναι δραστική διακόπτοντας έτσι την αλληλουχία των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις της δεύτερης περίπτωσης είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνες για την αντιμετώπιση της ανεξέλεγκτης δημιουργίας ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα. Ενώσεις με τέτοιες ιδιότητες είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή κ.ά. Οι ενώσεις που μπορούν με τον τρόπο αυτό να διακόψουν την αλυσίδα αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών ονομάζονται εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών ή αντιοξειδωτικά.

### 1.2.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

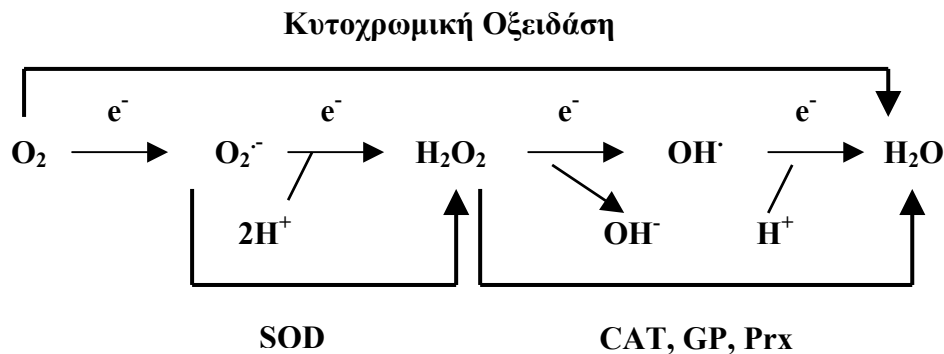
Το οξυγόνο, όπως είναι γνωστό, αποτελεί το πιο βασικό χημικό στοιχείο για την ύπαρξη της ζωής. Ωστόσο, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται από μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον κυριότερο παράγοντα δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής [Bruyninckx et al., 1978; Shigenaga et al., 1994]. Ο διττός αυτός ρόλος του οξυγόνου αποκαλείται συνήθως «παράδοξο του οξυγόνου».

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το 98% του μοριακού οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα ανάγεται σε νερό, καθώς το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται από τις οξειδωτικές διεργασίες του καταβολισμού [Halliwell B., 1984]. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση, που αποτελεί το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το ένζυμο αυτό λαμβάνει 4 ηλεκτρόνια από 4 μόρια κυτοχρώματος c (οξειδώνοντας το σίδηρο

στο κέντρο της αίμης από  $\text{Fe}^{2+}$  σε  $\text{Fe}^{3+}$ ) και τα χρησιμοποιεί για την αναγωγή ενός μορίου  $\text{O}_2$  σε δύο μόρια νερού, διευκολύνοντας έτσι την παραγωγή ενέργειας υπό μορφή ATP (διαδικασία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) (αντίδραση 4).



Όμως, το αναγωγικό περιβάλλον που επικρατεί στα κύτταρα επιτρέπει σε ένα μικρό ποσοστό του προσλαμβανόμενου μοριακού οξυγόνου (2%) να ανάγεται, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια, σχηματίζοντας ενδιάμεσες μορφές αναγωγής οξυγόνου, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), η υδροϋπεροξειδική ρίζα ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και η εξαιρετικά δραστική ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) που ονομάζονται «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου» (Reactive Oxygen Species, ROS) (εικόνα 1). Κατά αυτόν τον τρόπον οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Στον πίνακα 1 αναγράφονται οι σημαντικότερες «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου». Όπως παρατηρείται μόνο μερικές από αυτές είναι ελεύθερες ρίζες.



**Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.** Οι συντμήσεις SOD, CAT, GP, Prx, συμβολίζουν τα ένζυμα δισμουτάσες του σουπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και περοξυρεδοξίνες αντίστοιχα.

Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικές « Δραστικές Μορφές Οξυγόνου».

<i>Ένωση</i>	<i>Χημικό σύμβολο</i>
<i>Ελεύθερες ρίζες</i>	
Ανιόν σουπεροξειδίου	$O_2^{\bullet -}$
Υδροϋπεροξειδική ρίζα	$HO_2^{\bullet}$
Ρίζα υδροξυλίου	$\bullet OH$
Ρίζες αλκοξειδίων	$RO^{\bullet}$
Ρίζες υπεροξειδίων	$ROO^{\bullet}$
<i>Μη-ελεύθερες ρίζες</i>	
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	$H_2O_2$
Οργανικά υδροπεροξειδία	$ROOH$
Μονήρες οξυγόνο	$^1O_2$
Όζον	$O_3$
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$

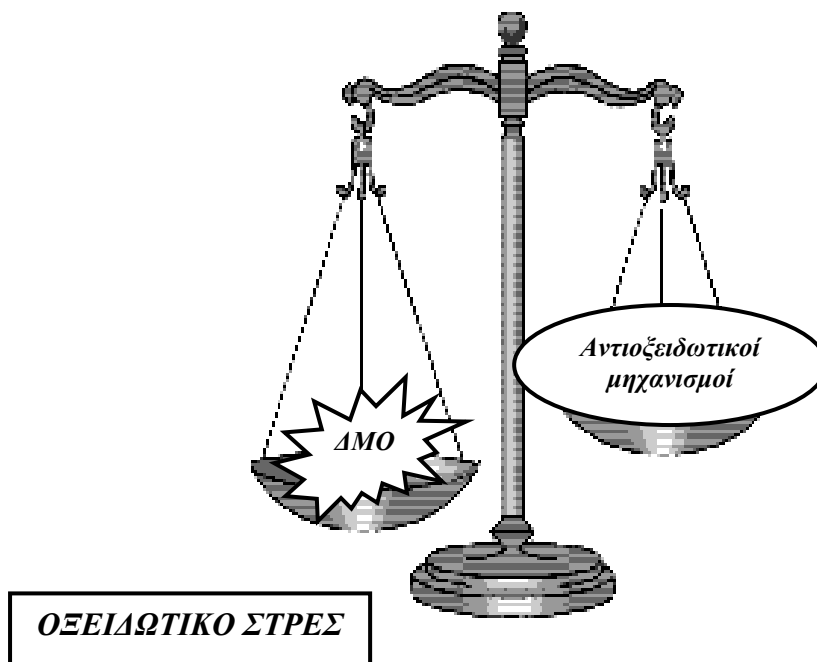
Ωστόσο, η συνεχής συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου θα ήταν καταστρεπτική για το κύτταρο. Για το λόγο αυτό, η ενδοκυττάρια παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου αντισταθμίζεται με την απομάκρυνσή τους μέσω αμυντικών ενζυμικών συστημάτων που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωσή τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενζυμικών συστημάτων αποτελούν οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (Superoxide Dismutases, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GP) και οι περοξυρεδοξίνες (Peroxiredoxines, Prx) (εικόνα 1).

Οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου, οι οποίες απαντώνται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, αποτελούν ένα σύστημα απομάκρυνσης του  $O_2^{\bullet -}$  [McCord et al., 1969]. Η απομάκρυνση όμως του  $O_2^{\bullet -}$  συνεπάγεται τη δημιουργία  $H_2O_2$ , το οποίο επίσης πρέπει να απομακρυνθεί. Αυτό επιτυγχάνεται με τρία είδη ενζύμων: α) την καταλάση, β) την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και γ) τις περοξυρεδοξίνες. Τα ένζυμα αυτά έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν το  $H_2O_2$  με δύο ηλεκτρόνια σε  $H_2O$ ,

παρακάμπτοντας με τον τρόπο αυτό τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου [Chance et al., 1979; Wood et al., 2003].

### 1.2.3. Οξειδωτικό στρες

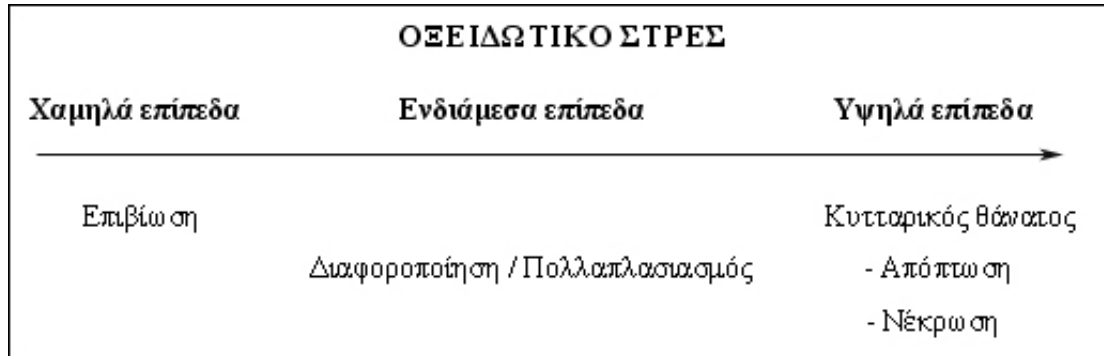
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου εξισορροπείται κατά κανόνα στους αερόβιους οργανισμούς από τη δράση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών συστημάτων. Η ισορροπία αυτή είναι δυναμική με δυνατότητα αλλαγής προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση. Στην περίπτωση που η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων διαταράσσεται υπέρ των πρώτων, τότε προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες [Sies and Cadenas, 1985] (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας οξειδωτικού στρες.

Ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες, οι επιδράσεις στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες ποικίλλουν. Η έκθεση των κυττάρων σε χαμηλή ένταση οξειδωτικού στρες έχει διαπιστωθεί ότι οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων ενώ η έκθεσή τους σε ενδιάμεσα επίπεδα οξειδωτικού στρες επάγει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Αντιθέτως, υψηλή ένταση οξειδωτικού στρες έχει ως

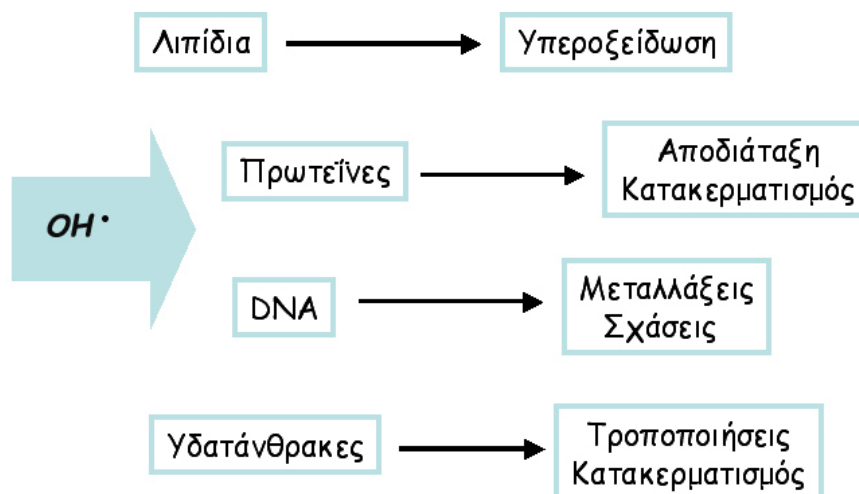
αποτέλεσμα ακόμη και τον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης είτε μέσω της νέκρωσης [Chandra et al., 2000; Antunes and Cadenas, 2001] (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Απεικόνιση των επιδράσεων του σταδιακά αυξανόμενου οξειδωτικού στρες σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

#### 1.2.4. Βλαπτικές επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών σε κυτταρικά συστατικά

Όταν στο κύτταρο επικρατούν συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται ενδοκυττάρια μπορούν να αντιδράσουν και να τροποποιήσουν όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά, όπως είναι τα λιπίδια των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεοτίδια του DNA και οι υδατάνθρακες (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Τροποποιήσεις βασικών συστατικών του κυττάρου (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA, υδατάνθρακες) μετά από την οξείδωσή τους από ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου.

Για παράδειγμα, η εκτεταμένη λιπιδιακή υπεροξειδωση στις βιολογικές μεμβράνες προκαλεί διαταραχές στη ρευστότητα αυτών, μείωση του μεμβρανικού δυναμικού, αύξηση της διαπερατότητας στα  $H^+$  αλλά και σε άλλα ιόντα και πιθανόν λύση αυτών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών. Επιπρόσθετα, η αντίδραση των ελεύθερων ριζών με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών επηρεάζει τη δομή και κατ' επέκταση τη γενικότερη λειτουργία των πρωτεϊνών. Ακόμη, οξειδωτικές τροποποιήσεις των νουκλεϊκών πολυμερών οδηγούν σε αναστολή του διπλασιασμού και της μεταγραφής του DNA καθώς και σε μεταλλάξεις που μπορεί να επιφέρουν ακόμη και το θάνατο του κυττάρου.

Αποφασιστικό ρόλο στη δημιουργία των δραστικών ελεύθερων ριζών που μπορούν να προκαλέσουν τις παραπάνω επιπτώσεις στα κύτταρα κατέχει η διαθεσιμότητα ή μη των οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου τα οποία καταλύουν τη μετατροπή των σχετικά ανενεργών υπεροξειδίων στις εξαιρετικά δραστικές υπεροξειδικές ρίζες [Galaris and Pantopoulos, 2008].

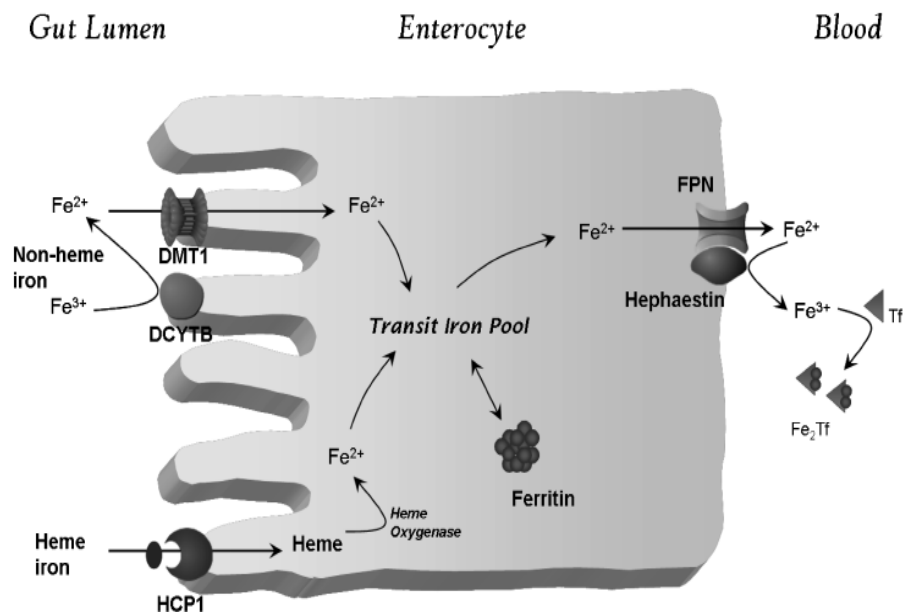
### **1.3. Ομοιοστασία του σιδήρου**

#### **1.3.1. Απορρόφηση του σιδήρου**

Μια δίαιτα δυτικού τύπου αξιολογείται ότι περιλαμβάνει περίπου 15 mg σιδήρου ημερησίως, από τα οποία απορροφώνται μόνο 1-2 mg κατά μέσο όρο. Η απορρόφηση του σιδήρου από το επιθήλιο του εντέρου ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Σε φυσιολογικές συνθήκες απορροφάται το 10% της προσλαμβανόμενης ποσότητας σιδήρου, σε συνθήκες υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο η ποσότητα αυτή ελαττώνεται, ενώ σε ένδεια σιδήρου η απορρόφηση μπορεί να φτάσει το 40% της προσλαμβανόμενης ποσότητας. Ο σίδηρος της διατροφής που προσλαμβάνεται και είναι διαθέσιμος για απορρόφηση ανήκει σε δύο κατηγορίες: τον αιμικό ή οργανικό σίδηρο που είναι συνδεδεμένος με την αίμη (heme iron) και το μη αιμικό ή ανόργανο σίδηρο (non-heme iron). Η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη και μερικά ένζυμα στο κρέας, το κοτόπουλο και τα ψάρια είναι οι κύριες πηγές του αιμικού σιδήρου στη δίαιτα. Παρόλο που η ποσότητα του αιμικού σιδήρου στη δίαιτα αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 15% της συνολικής ποσότητας σιδήρου

που προσλαμβάνεται, ο αιμικός σίδηρος είναι ιδιαίτερα σημαντικός λόγω της αυξημένης απορρόφησής του [Carpenter CE., 1992]. Αντίθετα, ο μη αιμικός σίδηρος βρίσκεται κυρίως σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και σε γαλακτοκομικά προϊόντα και απορροφάται σε ποσοστό μόλις 2 με 10% [Stipanuk, 2000].

Υπεύθυνα για την απορρόφηση και των δύο μορφών σιδήρου είναι τα εντεροκύτταρα που εντοπίζονται κυρίως στις λάχνες του δωδεκαδακτύλου και δευτερευόντως στο ανώτερο τμήμα της νήστιδας [Muir and Hopfer, 1985]. Ο μη αιμικός σίδηρος της τροφής, παρουσία του χαμηλού pH του γαστρικού υγρού, απελευθερώνεται από τα συστατικά των τροφίμων στα οποία περιέχεται και ανάγεται σε δισθενή σίδηρο με τη βοήθεια της αναγωγάσης Dcytb (Duodenal cytochrome b) που εντοπίζεται στη μεμβράνη της προσαύλιας επιφάνειας των εντεροκυττάρων [McKie et al., 2000] (εικόνα 5). Στη συνέχεια, ο δισθενής σίδηρος με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης μεταφοράς δισθενών μετάλλων DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) (που είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως DCT1 ή Nramp2) μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα του εντεροκυττάρου.



**Εικόνα 5. Απορρόφηση του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα.** Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων που λαμβάνουν χώρα κατά την απορρόφηση του αιμικού και μη αιμικού σιδήρου από τα εντεροκύτταρα. DCYTB (Duodenal Cytochrome B), DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), HCP1 (Heme Carrier Protein 1), FPN (Ferroportin), Tf (Transferrin).

Η DMT1 δεν είναι ειδική μόνο για τη μεταφορά σιδήρου, αλλά μπορεί να μεταφέρει επίσης άλλα δισθενή μέταλλα όπως μαγγάνιο, κοβάλτιο, χαλκό, ψευδάργυρο, κάδμιο και μόλυβδο [Fleming et al., 1997; Gunshin et al., 1997]. Μεταλλάξεις του γονιδίου της DMT1 σε μοντέλα πειραματόζωων ( $m/k^{-/-}$  ποντίκια και Belgrade αρουραίοι) οδηγούν σε σοβαρή υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία λόγω της μειωμένης απορρόφησης και ανακύκλωσης του σιδήρου.

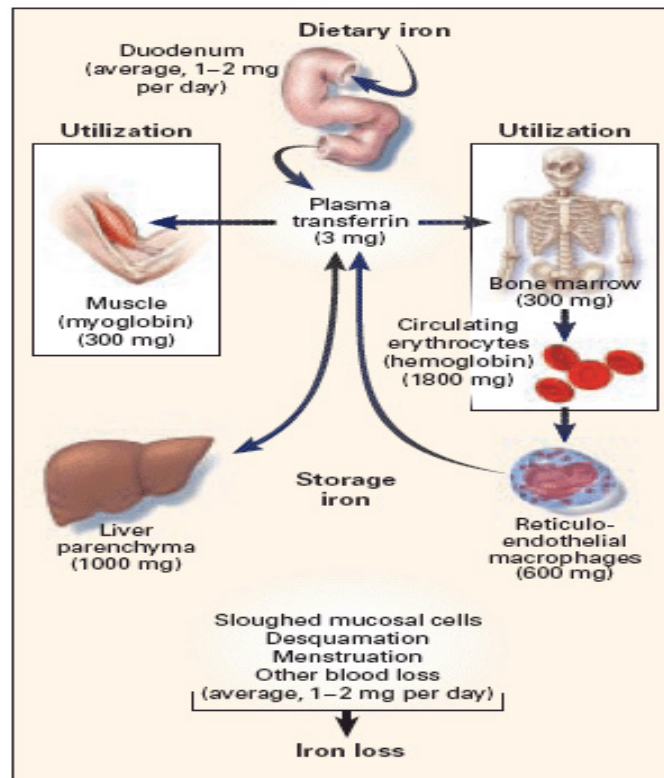
Όσον αφορά τη μεταφορά του αιμικού σιδήρου της τροφής στο κυτταρόπλασμα του εντεροκυττάρου, αυτή πραγματοποιείται με μηχανισμούς οι οποίοι προς το παρόν δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, καθώς η πρωτεΐνη μεταφοράς της αίμης HCP1 (Heme Carrier Protein 1) [Shayeghi M. et al., 2005] αποδείχτηκε σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες ότι έχει ως πρωταρχικό της ρόλο τη μεταφορά του φολικού οξέος [Qiu et al., 2006]. Μόλις η αίμη βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, καταβολίζεται από την οξυγενάση της αίμης-1 (Heme Oxygenase-1) και απελευθερώνεται ο δισθενής σίδηρος [Ferris et al., 1999] (εικόνα 5).

Σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν προηγουμένως, στο κυτταρόπλασμα του εντεροκυττάρου προκύπτει μια κοινή «δεξαμενή» δισθενούς σιδήρου (Transit Iron Pool), που προέρχεται τόσο από τον αιμικό όσο και από το μη αιμικό σίδηρο. Από τη «δεξαμενή» αυτή, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού για σίδηρο, τα ιόντα σιδήρου είτε αποθηκεύονται με τη μορφή της φερριτίνης στα εντεροκύτταρα είτε μεταφέρονται διαμέσου της βασικής επιφάνειας αυτών στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αποδίδονται στην τρανσφερρίνη του πλάσματος, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αποφυγή των τοξικών επιπτώσεών τους. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φερροπορτίνη (FPN) [Donovan et al., 2000] (που είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως IREG1 [McKie et al., 2000], SCLC40A1, MTP1 [Abboud and Haile, 2000]), η οποία λειτουργεί σε συνεργασία με την πρωτεΐνη ηφαιστίνη (hephaestin) [Vulpe et al., 1999] (εικόνα 5). Η ηφαιστίνη αποτελεί μια οξειδάση που οξειδώνει το δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, ώστε τα ιόντα σιδήρου να δεσμευτούν στην τρανσφερρίνη του πλάσματος και να είναι διαθέσιμα για την περαιτέρω κατανομή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου της φερροπορτίνης σε εντεροκύτταρα ποντικών οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη αναιμίας και συσσώρευση του σιδήρου στα εντεροκύτταρα, υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό τη σημασία της φερροπορτίνης στο μεταβολισμό του σιδήρου [Donovan et al., 2005].



### 1.3.2. Κατανομή και ανακύκλωση του σιδήρου στον οργανισμό

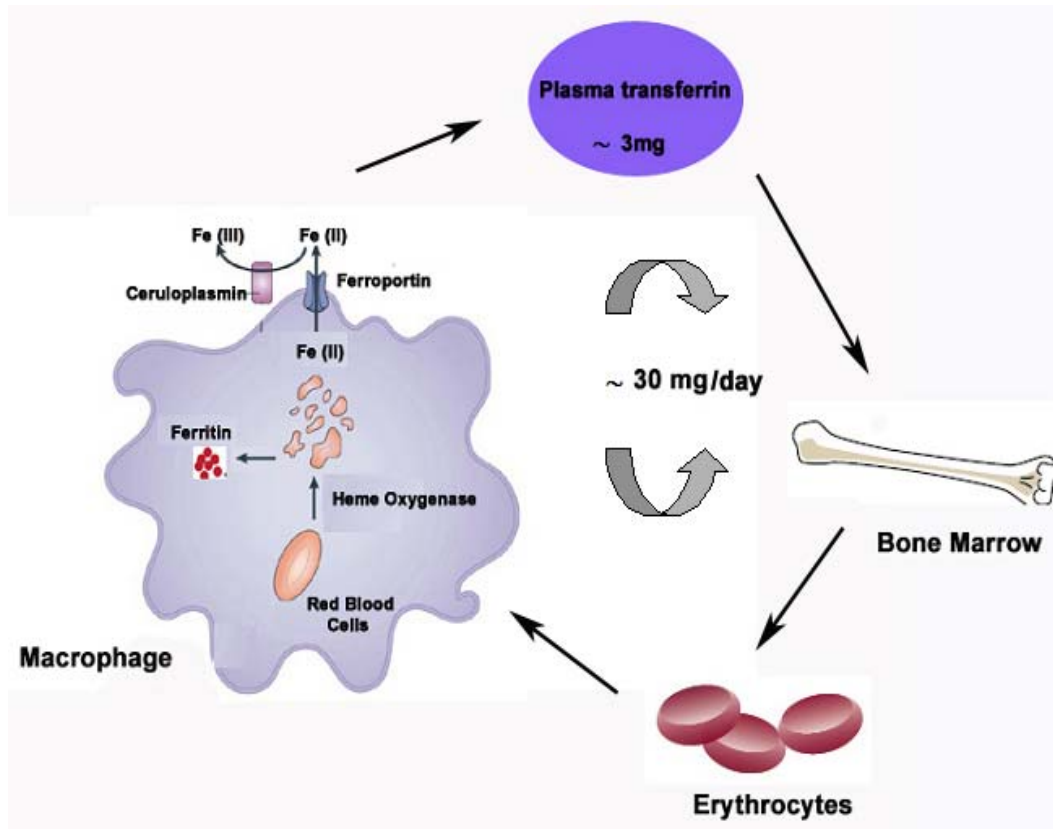
Το ανθρώπινο σώμα περιέχει κατά προσέγγιση 3-5 g σιδήρου [Bothwell et al., 1979]. Η συνολική ποσότητα του σιδήρου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το βάρος, η ηλικία, το φύλο και η διατροφή. Η αναλογία του σιδήρου ως προς το σωματικό βάρος υπολογίζεται σε 45 mg/kg για τους ενήλικες άνδρες και 35 mg/kg για τις γυναίκες. Τα χαμηλότερα επίπεδα που παρατηρούνται στις γυναίκες σχετίζονται με τη μικρότερη μυϊκή μάζα, τη μικρότερη μάζα του ήπατος και την έμμηνου ρύση [Andrews NC., 1999]. Η μεγαλύτερη ποσότητα του σιδήρου (1800 mg) χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων [Ponka, 1997; Andrews NC., 1999], ενώ η εναπομένουσα ποσότητα είτε αποθηκεύεται στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος (1000 mg) είτε χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της μυοσφαιρίνης των σκελετικών μυών (300 mg) είτε βρίσκεται στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (600 mg) (storage iron). Ένα μικρό ποσό σιδήρου (~3 mg) βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος συνδεδεμένο με την κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου στο αίμα, την τρανσφερρίνη (transport iron) (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Κατανομή του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό.

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η ημερήσια πρόσληψη σιδήρου ανέρχεται σε 1-2 mg και αναπληρώνει τις απώλειες σιδήρου που οφείλονται στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα, του δέρματος και του ουροποιητικού συστήματος, καθώς και στον ιδρώτα, ενώ στην περίπτωση γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας οφείλονται σε έναν ακόμη λόγο, την έμμηνο ρύση [Brittenham GM., 1991]. Επιπλέον ποσότητες σιδήρου μπορεί να χαθούν από τυχόν αιμορραγίες και την αιμοδοσία.

Όμως, για τη διαδικασία της ερυθροποίησης απαιτείται η πρόσληψη 30-40 mg σιδήρου την ημέρα από τις αναπτυσσόμενες ερυθροβλάστες του μυελού των οστών για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης [Vaisman et al., 2000]. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιείται μια συνεχής ανακύκλωση του υπάρχοντος σιδήρου στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος με τον ακόλουθο τρόπο: στο μυελό των οστών δημιουργούνται 2-3 εκατομμύρια νέα ερυθρά αιμοσφαίρια ανά δευτερόλεπτο και ταυτόχρονα ένας ανάλογος αριθμός «γηρασμένων» ερυθροκυττάρων απομακρύνεται από την κυκλοφορία του αίματος κυρίως από μακροφάγα του σπληνός και του ήπατος [Knutson and Wessling-Resnick, 2003] (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ανακύκλωση του σιδήρου από τα μακροφάγα.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα μακροφάγα διακρίνουν τα «γηρασμένα» και κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά φαίνεται να σχετίζεται με μορφολογικές αλλαγές στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, οι οποίες βοηθούν στην αναγνώριση τους από τα μακροφάγα του σπληνός [Wrighting DM. and Andrews NC., 2008]. Με τη σύνδεση των «γηρασμένων» ερυθροκυττάρων στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων αρχίζει η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης και η διαμεσολαβούμενη από τα λυσοσώματα αποικοδόμηση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Ακολούθως, η αίμη καταβολίζεται στο κυτταρόπλασμα από την οξυγενάση της αίμης-1 (heme oxygenase-1) και απελευθερώνεται ο δισθενής σίδηρος (εικόνα 7). Ένα μέρος του σιδήρου αυτού αποθηκεύεται στα μακροφάγα ως φερριτίνη (ferritin), ενώ το υπόλοιπο μέρος εξέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος με τη μεσολάβηση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φερροπορτίνη (ferroportin) [Donovan et al., 2000] για να αποδοθεί στην τρανσφερρίνη. Η φερροπορτίνη ενεργοποιείται στα μακροφάγα ως απόκριση στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των «γηρασμένων» ερυθρών αιμοσφαιρίων [Canonpe-Hergaux et al., 2006]. Ωστόσο, επειδή η φερροπορτίνη έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει ιόντα δισθενούς σιδήρου αυτά θα πρέπει να οξειδωθούν σε τρισθενή, ώστε να μπορούν να συνδεθούν στην τρανσφερρίνη του πλάσματος. Η οξείδωση αυτή πραγματοποιείται από την οξειδάση σερουλοπλασμίνη (ceruloplasmin) [Harris et al., 1999]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας επιπρόσθετος ρόλος της σερουλοπλασμίνης. Η παρουσία της φαίνεται να κρίνεται απαραίτητη για τη διατήρηση της φερροπορτίνης στην επιφάνεια των κυττάρων [De Domenico et al., 2007a]. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί πειραματικά δεδομένα προηγούμενων μελετών σύμφωνα με τα οποία η ανεπάρκεια της σερουλοπλασμίνης είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση σιδήρου στα μακροφάγα, το χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης και συχνά την ανάπτυξη ήπιας αναιμίας [Harris et al., 1995].

Η ποσότητα του σιδήρου που βρίσκεται συνδεδεμένη στην τρανσφερρίνη του πλάσματος είναι μικρή (~3 mg) σε σχέση με τις ανάγκες των ερυθροβλαστών (~30 mg την ημέρα). Κατά συνέπεια, η δεξαμενή αυτή του σιδήρου ανακυκλώνεται περίπου 10 φορές την ημέρα, ενώ κάθε άτομο σιδήρου που εισέρχεται στον ορό παραμένει εκεί κατά μέσο όρο μόνο για περίπου 90 λεπτά. Είναι φανερό ότι αυτή η δυναμική ισορροπία μεταξύ της εισόδου και της απομάκρυνσης του σιδήρου από τον ορό του αίματος, εάν διαταραχθεί, μπορεί εύκολα να δημιουργήσει προβλήματα στη

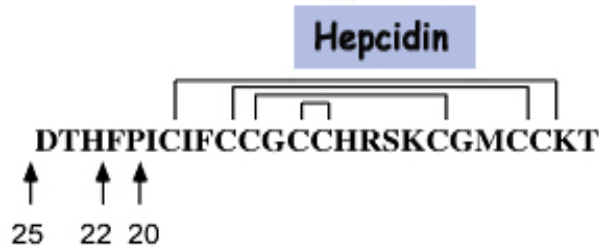
φυσιολογική ροή σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης και κατ' επέκταση στη δημιουργία ικανού αριθμού ερυθροκυττάρων.

### 1.3.3. Ο ρόλος της ηπατιδίνης

Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί και ειδικότερα ο άνθρωπος έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς για τον ακριβή έλεγχο της ομοιοστασίας του σιδήρου τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Οι μηχανισμοί αυτοί ρυθμίζουν σε αυστηρά πλαίσια τη διακύμανση των επιπέδων του σιδήρου, εξασφαλίζοντας αφενός μεν την απρόσκοπτη παροχή σιδήρου για τη διαδικασία της ερυθροποίησης και της σύνθεσης πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο και αφετέρου δε την ασφαλή αποθήκευσή του σε συνθήκες οξειδωτικού στρες όπου η παρουσία του δύναται να αποβεί επικίνδυνη. Η ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου καθίσταται κριτικής σημασίας καθώς η διαταραχή της μπορεί να οδηγήσει είτε σε ανεπάρκεια σιδήρου και κατά συνέπεια σε ανάπτυξη αναιμίας είτε σε υπερφόρτωση σιδήρου με δυσάρεστες για τον οργανισμό επιπτώσεις. Κεντρικό ρόλο στην κατανόηση αυτών των μηχανισμών κατέχει η ανακάλυψη του πεπτιδίου της ηπατιδίνης, το οποίο σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη φερροπορτίνη ελέγχει την έξοδο του σιδήρου από τα κύτταρα.

Η ηπατιδίνη είναι ένα μικρό πεπτίδιο, πλούσιο σε κυστεΐνες, με αντιμικροβιακή δράση καθώς ελαττώνει την ποσότητα του κυκλοφορούντος σιδήρου που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη δράση των περισσότερων μικροοργανισμών. Συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ [Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001] και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος όπου δεσμεύεται στην α2-μακροσφαιρίνη [Peslova et al., 2009], ενώ αποβάλλεται μέσω των νεφρών. Μικρότερα επίπεδα ηπατιδίνης εκφράζονται και σε άλλα κύτταρα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λιποκυττάρων και των εγκεφαλικών κυττάρων. Το γονίδιο της ηπατιδίνης HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide) στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13 και κωδικοποιεί την παραγωγή ενός προ-πεπτιδίου 84 αμινοξέων. Το ώριμο και βιολογικά δραστικό προϊόν, που αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή του προ-πεπτιδίου, υπάρχει σε τρεις κυρίως μορφές, των 20, 22 και 25 αμινοξέων και ανιχνεύεται στον ανθρώπινο ορό και στα ούρα [Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Ganz, 2003] (εικόνα 8). Η

ηπατιδίνη σύμφωνα με δομικές μελέτες NMR (Nuclear Magnetic Resonance) περιέχει οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης και σχηματίζει μια δομή απλής φουρκέτας, η οποία σταθεροποιείται με τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης, ένας εκ των οποίων είναι ασυνήθιστος καθώς δημιουργείται μεταξύ δυο γειτονικών καταλοίπων [Jordan et al., 2009].

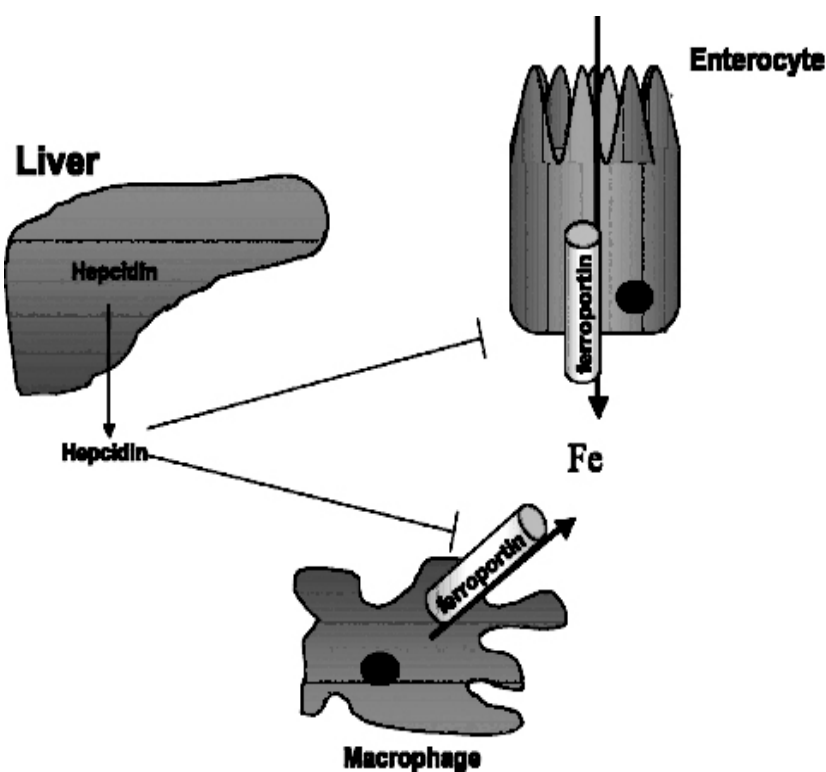


**Εικόνα 8.** Αλληλουχία του ώριμου πεπτιδίου της ηπατιδίνης του ανθρώπου. Τα βέλη υποδηλώνουν τις θέσεις σχάσης από τις οποίες προκύπτουν οι ισομορφές των 25, 22 και 20 αμινοξέων, αντίστοιχα.

Η συμμετοχή της ηπατιδίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου διαπιστώθηκε, όταν αποδείχτηκε ότι η έκφρασή της επάγεται από το διαιτητικά προσλαμβανόμενο σίδηρο [Pigeon et al., 2001]. Επιπλέον, μελέτες σε μοντέλα ποντικών που δεν εκφράζουν ηπατιδίνη (USF2<sup>-/-</sup> ποντίκια) καταδεικνύουν την υπερφόρτωση αυτών με σίδηρο και την εκδήλωση φαινοτύπου παρόμοιου με αυτόν της αιμοχρωμάτωσης [Nicolas et al., 2001]. Αντίθετα, υπερέκφραση της ηπατιδίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρής σιδηροπενικής αναιμίας και ακολούθως σε αυξημένη θνησιμότητα λίγες ώρες μετά τη γέννησή τους [Nicolas et al., 2002]. Η εμπλοκή της ηπατιδίνης στην παθογένεση διαταραχών της ομοιοστασίας του σιδήρου στον άνθρωπο αποδείχτηκε μετά την ταυτοποίηση μεταλλάξεων του γονιδίου της ηπατιδίνης σε ασθενείς με νεανική αιμοχρωμάτωση [Roetto et al., 2003; 2004]. Επιπρόσθετα, διαταραχές της έκφρασης της ηπατιδίνης παρουσιάζονται και σε άλλους τύπους κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης που προκαλούνται από μεταλλάξεις των γονιδίων HFE (Human Hemochromatosis), TfR2 (Transferrin receptor-2) ή HJV (Hemojuvelin) που συμμετέχουν στην ομοιοστασία του σιδήρου [Bribble et al., 2003; Nemeth et al., 2005; Babbit et al., 2006]. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι σε χρόνιες καταστάσεις φλεγμονής, η υπερέκφραση της ηπατιδίνης συμβάλλει στην ανάπτυξη της αναιμίας χρόνιας νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από ένδεια σιδήρου στον ορό

του αίματος καθώς ο σίδηρος «εγκλωβίζεται» στο εσωτερικό των μακροφάγων [Weiss, 2002; Nicolas et al., 2002; Nemeth et al., 2003; 2004].

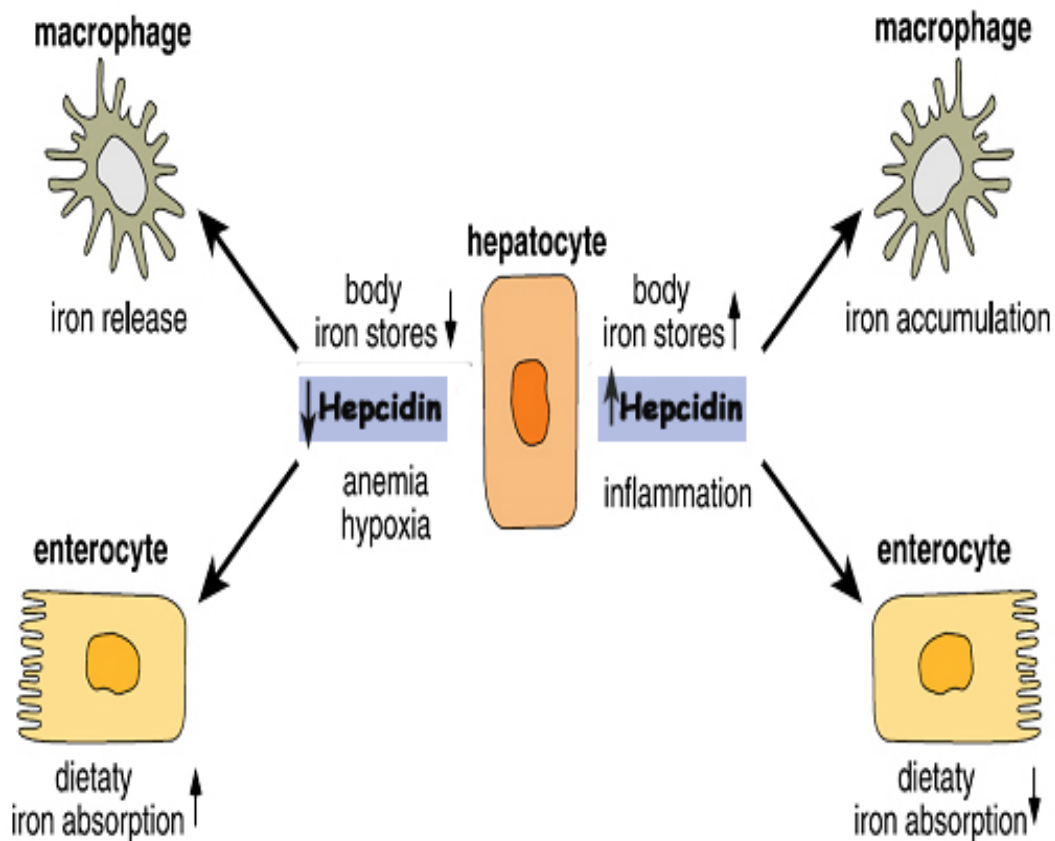
Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της ηπατιδίνης αποσαφηνίστηκαν την τελευταία δεκαετία, όταν βρέθηκε ότι η ηπατιδίνη προσδέεται στη φερροπορτίνη, το μόνο γνωστό κυτταρικό εξαγωγέα σιδήρου που εκφράζεται σε ηπατοκύτταρα, μακροφάγα και εντεροκύτταρα, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό την έξοδο του σιδήρου από τα συγκεκριμένα κύτταρα [Donovan et al., 2000] (εικόνα 9). Πρόσφατα αναγνωρίστηκε η ακριβής θέση πρόσδεσης της ηπατιδίνης στη φερροπορτίνη [De Domenico et al., 2008]. Έχει προταθεί ότι η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε φωσφορυλίωση της φερροπορτίνης σε κατάλοιπα τυροσίνης και ακόλουθη ενδοκύττωση και αποικοδόμηση του φωσφορυλιωμένου μορίου στα λυσοσώματα [De Domenico et al., 2007].



Εικόνα 9. Η πρόσδεση της ηπατιδίνης στη φερροπορτίνη αναστέλλει την έξοδο του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα και τα μακροφάγα.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο οργανισμός παράγει και διατηρεί τα επίπεδα της ηπατιδίνης σχετικά σταθερά. Χαμηλά επίπεδα ηπατιδίνης πυροδοτούν την αύξηση της απορρόφησης του διαιτητικά προσλαμβανόμενου σιδήρου από τα

εντεροκύτταρα και την απελευθέρωση του σιδήρου από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Αντίθετα, υψηλά επίπεδα ηπατιδίνης, μέσω της πρόσδεσής της στη φερροπορτίνη, οδηγούν σε αναστολή της απορρόφησης του διαιτητικά προσλαμβανόμενου σιδήρου από το έντερο και σε «εγκλωβισμό» του σιδήρου στα μακροφάγα (εικόνα 10). Η παραμονή του σιδήρου στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή του από τον οργανισμό, καθώς τα εντεροκύτταρα επιτελούν τη λειτουργία τους για δύο μόνο ημέρες πριν αποφορτωθούν από τις κορυφές των λαχνών της εντερικής κοιλότητας. Έτσι, η μεταφορά του σιδήρου μέσω της φερροπορτίνης αποτελεί το τελικό κριτήριο για το αν ο σίδηρος θα φτάσει στην τρανσφερρίνη του αίματος ή θα απομακρυνθεί από το σώμα [Andrews, 2008].



**Εικόνα 10. Μοντέλο ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου σε επίπεδο οργανισμού.** Στο μοντέλο αυτό κυρίαρχο ρόλο παίζει η ηπατιδίνη, η οποία ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα του σιδήρου με βάση τις ανάγκες ερυθροποίησης, την υποξία, τις αποθήκες σιδήρου και τη φλεγμονή.

Η ρύθμιση της έκφρασης της ηπατιδίνης από το ήπαρ υπαγορεύεται από ερεθίσματα που έχουν ως στόχο την εξασφάλιση επαρκούς ποσότητας σιδήρου στο σώμα για την κάλυψη των αναγκών της ερυθροποίησης. Ωστόσο, η ποσότητα αυτή δεν πρέπει να ξεπερνάει ένα όριο, μετά το οποίο ο σίδηρος καθίσταται τοξικός για τον οργανισμό. Τέτοια ερεθίσματα είναι η συγκέντρωση του σιδήρου στον οργανισμό, η φλεγμονή, η υποξία και γενικότερα οι αυξημένες ανάγκες της ερυθροποίησης (εικόνα 10). Συγκεκριμένα, η αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της ηπατιδίνης με σκοπό να αποτραπεί η συσσώρευσή του στον οργανισμό. Ανάλογη επίδραση έχει και η φλεγμονή. Παράγοντες φλεγμονής που επάγουν την έκφραση της ηπατιδίνης αποτελούν η ιντερλευκίνη-6 [Nemeth et al., 2004] και οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) [Roy et al., 2004]. Αντίθετα, η υποξία και γενικά οι αυξημένες ανάγκες ερυθροποίησης οδηγούν σε μείωση της παραγωγής της ηπατιδίνης, έτσι ώστε περισσότερος σίδηρος να είναι διαθέσιμος για την παραγωγή των ερυθροκυττάρων.

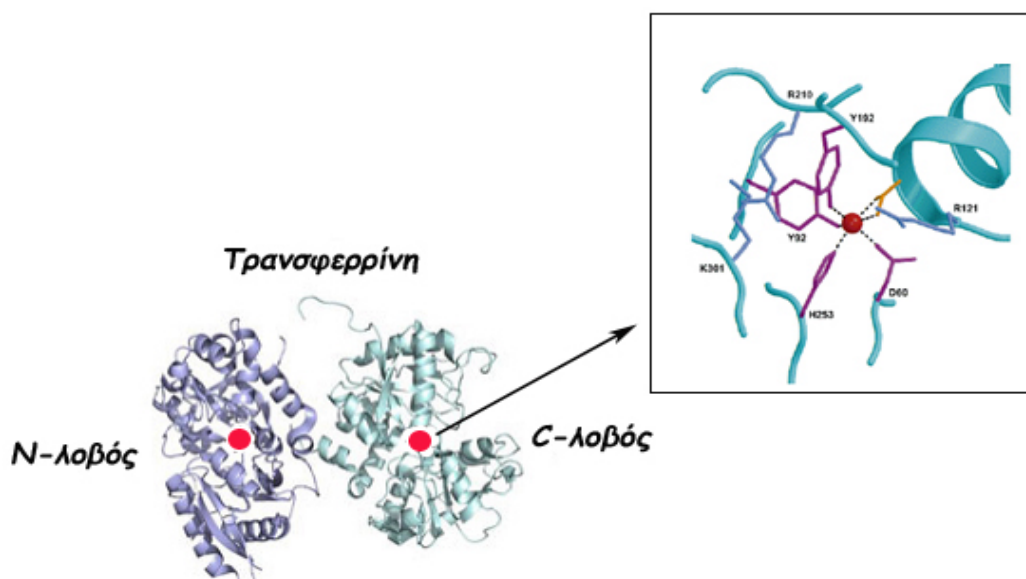
Λόγω του κυρίαρχου ρόλου της ηπατιδίνης στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου, η ηπατιδίνη έχει γίνει στόχος εντατικών βιοχημικών μελετών. Ωστόσο, δυσκολίες που παρατηρούνται στην εκτίμηση των επιπέδων της ηπατιδίνης σε διάφορες ασθένειες οφείλονται στην έλλειψη κατάλληλης δοκιμασίας για τη μέτρησή τους. Οι περισσότερες μέθοδοι στηρίζονται στη χρήση φασματοφωτομετρίας μάζας (SELDITOF-MS ή LCMS/MS) αλλά παρόλο που τα αποτελέσματά τους είναι ελπιδοφόρα, αυτές μέχρι στιγμής είναι ημιποσοτικές και απαιτούν τη χρήση εξειδικευμένων οργάνων. Τελευταία, η ερευνητική ομάδα της κ. Μαμαλάκη στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στην Αθήνα έχει επιτύχει την έκφραση μιας ανασυνδυασμένης μορφής της ηπατιδίνης (Hep-25His) στο ευκαρυωτικό σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia Pastoris*, η οποία είναι λειτουργική ως προς την αντιμικροβιακή δράση και τον κυτταρικό μεταβολισμό του σιδήρου [Koliaraki et al., 2008].

#### **1.3.4. Παρουσία του σιδήρου στον ορό του αίματος: ο ρόλος της τρανσφερρίνης**

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο σίδηρος στον ορό του αίματος βρίσκεται εξ ολοκλήρου συνδεδεμένος στην τρανσφερρίνη (transferrin, Tf). Η τρανσφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους ~80 kDa



υπεύθυνη αφενός μεν για τη μεταφορά του σιδήρου από τα σημεία απορρόφησης (εντεροκύτταρα) και ανακύκλωσης (μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος) προς τα κύτταρα που απαιτούν σίδηρο για τη διεκπεραίωση διαφόρων λειτουργιών, όπως είναι η ερυθροποίηση, και αφετέρου δε για την αποφυγή των τοξικών επιπτώσεων του σιδήρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και δευτερευόντως στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και στους ενδοκρινείς αδένες, όπως οι όρχεις και οι ωθήκες. Στη συνέχεια, καθώς εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος, δεσμεύεται αντιστρεπτά και με μεγάλη συγγένεια (σταθερά συγγένειας  $10^{23} \text{ M}^{-1}$ ) με δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου [Aisen et al., 1978; Yang et al., 1984]. Η σύνδεση των δύο ιόντων σιδήρου πραγματοποιείται στους δύο λοβούς, N και C, που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο και στο καρβοξυτελικό άκρο της τρανσφερρίνης, αντίστοιχα (εικόνα 11). Οι λοβοί αυτοί έχουν παρόμοια τριτοταγή δομή και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι το γονίδιο της τρανσφερρίνης έχει προκύψει από διπλασιασμό ενός αρχέγονου γονιδίου.



**Εικόνα 11. Δομή της τρανσφερρίνης.** Με κόκκινο χρώμα αναπαριστώνται τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου. Σε μεγέθυνση αναπαρίσταται ο ακριβής τρόπος σύνδεσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη.

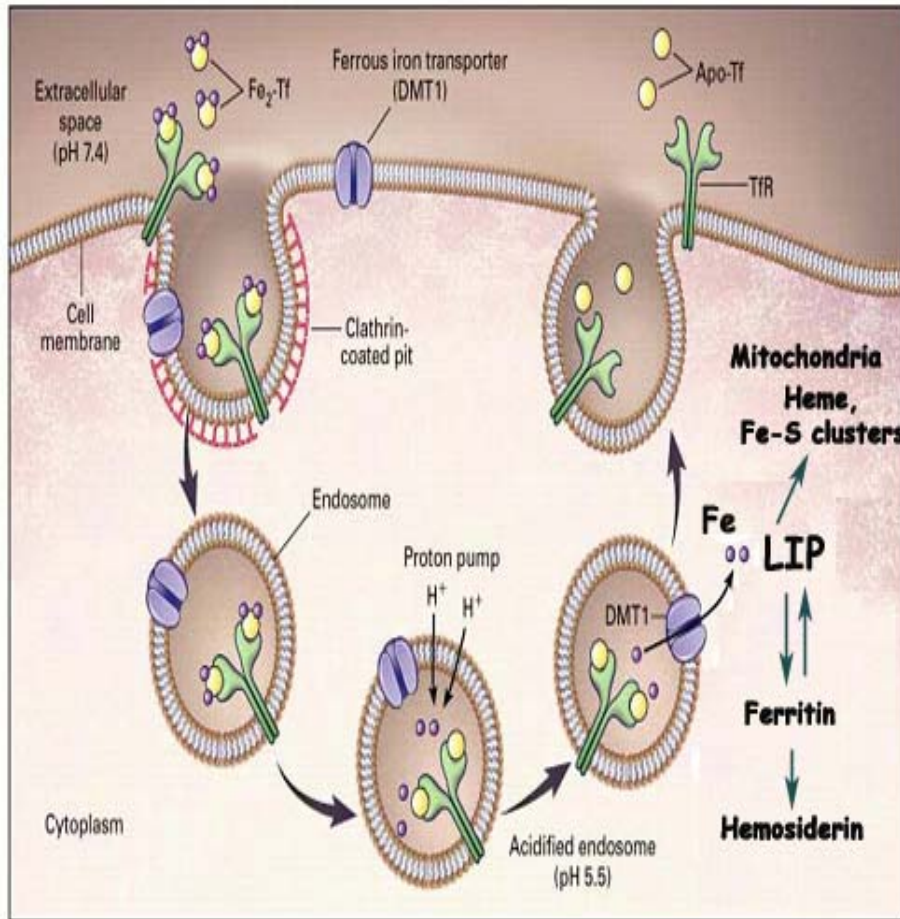
Κρυσταλλογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η θέση σύνδεσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη του ανθρώπου, σε φυσιολογικές τιμές pH (pH~7.4), εμπλέκει δύο τυροσίνες, μια ιστιδίνη, ένα ασπαρτικό οξύ και ένα διττανθρακικό ανιόν [Baker et al., 2003] (εικόνα 11). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συγκέντρωση της τρανσφερρίνης

στην κυκλοφορία του αίματος κυμαίνεται από 25 έως 50  $\mu\text{M}$  ενώ ο κορεσμός της είναι ~30%. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του σιδήρου και της τρανσφερρίνης στον ορό του αίματος, η τελευταία απαντάται σε τέσσερις μορφές: α) την αποτρανσφερρίνη (apotransferrin), δηλαδή την τρανσφερρίνη που δεν έχει δεσμεύσει σίδηρο, β) τη μονοσιδηρική (monoferric) τρανσφερρίνη που έχει δεσμεύσει σίδηρο στο N-λοβό, γ) τη μονοσιδηρική (monoferric) τρανσφερρίνη που έχει δεσμεύσει σίδηρο στο C-λοβό και δ) τη δισιδηρική (diferric) τρανσφερρίνη που έχει δεσμεύσει σίδηρο και στους δύο λοβούς [Chua A. and Graham R.M., 2007].

### 1.3.5. Πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα

Το σύμπλεγμα τρανσφερρίνη-σίδηρος ( $\text{Tf-Fe}_2^{3+}$ ) συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς τρανσφερρίνης (Transferrin Receptor 1 and 2, TfR1, TfR2) της επιφάνειας των κυττάρων με σκοπό τη μεταφορά του σιδήρου στο εσωτερικό αυτών [Klausner et al., 1983; Ponka et al., 1998]. Με εξαίρεση τα ώριμα ερυθροκύτταρα, υποδοχείς τρανσφερρίνης απαντώνται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασής τους ποικίλλουν. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων τρανσφερρίνης παρουσιάζονται κυρίως στις ερυθροβλάστες, στα κύτταρα του πλακούντα, του ήπατος καθώς και στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (κακοήθη και μη κακοήθη). Κάθε υποδοχέας δύναται να δεσμεύσει δύο μόρια δισιδηρικής τρανσφερρίνης. Μετά τη σύνδεση, το σύμπλεγμα τρανσφερρίνη-σίδηρος-υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 ( $\text{Tf-Fe}_2^{3+}$ -TfR1) εισέρχεται εντός του κυττάρου με το μηχανισμό της ενδοκύττωσης μέσα σε κυστίδια επενδεδυμένα με κλαθρίνη και άλλες πρωτεΐνες [Cheng et al., 2004] (εικόνα 12). Μετά την απελευθέρωση των επικαλυμμένων μορίων, τα κυστίδια συντήκονται με τα ενδοσωμάτια, ένα σύστημα κυστιδίων που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αρχικά κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (πρώιμα ενδοσωμάτια) και αργότερα κοντά στον πυρήνα (όψιμα ενδοσωμάτια). Στη μεμβράνη των ενδοσωματίων υπάρχουν αντλίες  $\text{H}^+$ , οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μείωση του pH των οργανιδίων αυτών. Το χαμηλό pH ( $\text{pH}\sim 5.5$ ) οδηγεί στην αποδέσμευση τόσο του τρισθενούς σιδήρου από την τρανσφερρίνη όσο και της τρανσφερρίνης από τον υποδοχέα της [Dautry-Varsat et al., 1983]. Στη συνέχεια, ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή από μέλη της οικογένειας των μεταλλοαναγωγασών STEAP

(six-transmembrane epithelial antigen of prostate protein) [Ohgami et al., 2005; 2006] και ακολούθως μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα σιδήρου DMT1 [Fleming et al., 1998; Su et al., 1998; Canonne-Hergaux et al., 2001].



**Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων.** Τα περισσότερα κύτταρα προσλαμβάνουν σίδηρο μέσω του μηχανισμού ενδοκύττωσης του συμπλέγματος τρανσφερρίνη-σίδηρος-υποδοχέας τρανσφερρίνης-1. Στα ενδοσωμάτια, λόγω του χαμηλού pH, ο σίδηρος απελευθερώνεται από την τρανσφερρίνη και ανάγεται σε δισθενή (Fe<sup>2+</sup>) από μέλη της οικογένειας των μεταλλοαναγωγασών STEAP πριν τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου από την πρωτεΐνη μεταφορέα του σιδήρου DMT1. Η τρανσφερρίνη και ο υποδοχέας τρανσφερρίνης επιστρέφουν στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ώστε να χρησιμοποιηθούν εκ νέου. Τελικά, ο σίδηρος που έχει απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα είτε μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια για την περαιτέρω χρησιμοποίησή του στη σύνθεση πρωτεϊνών, είτε αποθηκεύεται με τη μορφή της φερριτίνης, είτε παραμένει «ελεύθερος» ως οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP).

Ο μεταφορέας DMT1 φαίνεται να κατέχει διττό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, απαντάται και στην προσαύλια επιφάνεια των εντεροκυττάρων για τη μεταφορά του σιδήρου στο εσωτερικό των συγκεκριμένων κυττάρων (εικόνα 5). Παράλληλα, ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 και η αποτρανσφερρίνη επιστρέφουν στην επιφάνεια του κύτταρου με το μηχανισμό της εξωκύττωσης, όπου ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη ενώ η αποτρανσφερρίνη ελευθερώνεται στην κυκλοφορία ώστε να δεσμεύσει εκ νέου ιόντα σιδήρου (εικόνα 12). Η συγκεκριμένη ακολουθία γεγονότων αποτελεί την κύρια οδό πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα μέσω του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1. Αντίθετα, ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-2, που είναι ομόλογος του πρώτου και εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα ηπατοκύτταρα και στα αιμοποιητικά κύτταρα [Kawabata et al., 1999], δε δύναται να εξισορροπήσει την ανεπάρκεια σιδήρου που προκαλείται από την απουσία του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1.

Ένα σημαντικό μέρος του δισθενούς σιδήρου που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα αξιοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την ενσωμάτωσή του στο δακτύλιο της πρωτοπορφυρίνης IX για τη σύνθεση της αίμης, αλλά και τη σύνθεση συμπλόκων σιδήρου-θείου 2Fe-2S, 3Fe-4S ή 4Fe-4S (εικόνα 12). Η μεταφορά του σιδήρου σε αυτά τα οργανίδια πραγματοποιείται μέσω ενός μεταφορέα, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, την πρωτεΐνη «μιτοφερρίνη» (mitoferrin) [Shaw et al., 2006]. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να διευκολύνεται από την πρωτεΐνη ABCB10 (ATP-binding cassette, subfamily B, member 10), η οποία θεωρείται ότι σταθεροποιεί τη «μιτοφερρίνη» [Chen et al., 2009]. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ο σίδηρος δύναται να μεταφερθεί και απευθείας από τα ενδοσωμάτια στα μιτοχόνδρια μέσω άμεσης επαφής των μεμβρανών των οργανιδίων (μηχανισμός «kiss and run») [Sheftel et al., 2007].

Η περίσσεια του ενδοκυττάρου σιδήρου που δεν αξιοποιείται για μεταβολικές διαδικασίες αποθηκεύεται στη φερριτίνη του κυτταροπλάσματος σε μια βιοδιαθέσιμη και μη οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή, προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα από τις τοξικές επιπτώσεις του σιδήρου (εικόνα 12). Η φερριτίνη αποτελείται από 24 υπομονάδες βαριών (heavy chain) και ελαφριών αλυσίδων (light chain) που δημιουργούν μια κοίλη σφαίρα ικανή να αποθηκεύσει 4500 ιόντα τριθενούς σιδήρου [Arosio and Levi, review, 2010].

Ωστόσο, υπάρχει μια μικρή ποσότητα σιδήρου (<5% του συνολικού σιδήρου) στο κυτταρόπλασμα, η οποία είναι «ελεύθερη» και οξειδοαναγωγικά ενεργή (Labile

Iron Pool, LIP) καθώς δύναται να συμμετέχει σε τοξικές για το κύτταρο αντιδράσεις [Epsztejn et al., 1997] (εικόνα 12).

#### 1.4. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (Labile Iron Pool, LIP)

Στο κυτταρόπλασμα υπάρχει μια μικρή ποσότητα σιδήρου που είναι δεσμευμένη με μικρή συγγένεια με χηλικούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους (κιτρικό, ATP, AMP, πυροφωσφορικό), πολυπεπίδια και συστατικά μεμβρανών (φωσφολιπίδια) [Epsztejn et al., 1997]. Λόγω της ασθενούς δέσμευσής του με τους προαναφερθέντες παράγοντες, ο σίδηρος αυτός θεωρείται οξειδοαναγωγικά ενεργός, καθώς δύναται να συμμετέχει σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οι οποίες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οδηγούν στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών με τοξικές επιπτώσεις για το κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό, οι δεσμευμένοι με τον οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο χηλικοί παράγοντες καθίστανται ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη δράση των ελεύθερων ριζών υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Στη βιβλιογραφία, ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος παρουσιάζεται ως συνώνυμο του όρου «Labile Iron Pool, LIP». Ο όρος αυτός προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Greenberg and Wintrobe το 1946 [Greenberg and Wintrobe, 1946] ενώ το 1977 τροποποιήθηκε σε «transient iron pool» [Jacobs A., 1977]. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε ο όρος «chelatable iron», καθώς οι περισσότερες μέθοδοι για την ανίχνευσή του στηρίζονταν στη χρήση εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων [Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002]. Άλλοι όροι που του έχουν αποδοθεί είναι «ελεύθερος σίδηρος», «μεταβολικά και καταλυτικά ενεργός σίδηρος», «σίδηρος χαμηλού μοριακού βάρους» κ.ά. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλοι αυτοί οι όροι χρησιμοποιούνται σήμερα ως συνώνυμα, αν και δεν ταυτίζονται απόλυτα μεταξύ τους.

Το LIP αποτελεί πηγή άμεσα διαθέσιμου σιδήρου για μεταβολικές διεργασίες, όπως είναι η σύνθεση της αίμης και των συμπλόκων σιδήρου-θείου στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, η παρουσία του ενέχει και σοβαρό κίνδυνο, καθώς η αντίδρασή του με το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και άλλα οργανικά υπεροξειδία, που αποτελούν μόρια με χαμηλή δραστικότητα, οδηγεί στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου [Gutteridge and Halliwell, 2000]. Για το λόγο αυτό, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται ομοιοστατικοί μηχανισμοί του

οργανισμού, τόσο σε συστηματικό (ηπατιδίνη), όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (IRP-IRE σύστημα) [Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002] που περιορίζουν τα επίπεδά του. Η διατήρηση του LIP σε χαμηλά επίπεδα αποτελεί βασικό και αναπόσπαστο κομμάτι της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων η οποία όμως εξασφαλίζεται και μέσω διαφόρων ενζύμων που εξουδετερώνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου στα διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου [Kakhlon and Cabantchik, 2002; Breuer et al., 2008].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος μπορεί να εντοπιστεί και σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου, όπως στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρήνα [Petrat et al., 2002; Eaton JW. and Quian M., 2002; Tenopoulou et al., 2007]. Όσον αφορά την παρουσία του LIP στον πυρήνα και το ρόλο που διαδραματίζει στις οξειδωτικές βλάβες του DNA, έχει παρατηρηθεί σε λεμφοκύτταρα ανθρώπου ότι υπάρχει μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του LIP και της 8oxodGuo (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine), ενός τυπικού δείκτη οξειδωτικής καταστροφής του DNA [Gackowski et al., 2002].

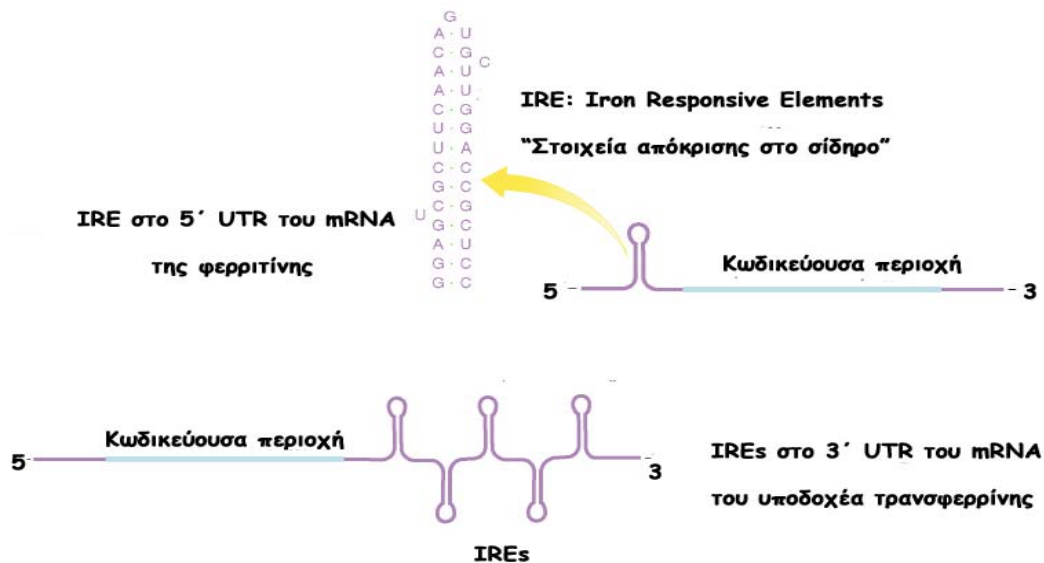
#### **1.4.1. Ρύθμιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) εντός των κυττάρων: σύστημα IRP-IRE**

Οι ζώντες οργανισμοί και ιδιαίτερα ο άνθρωπος έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς που ρυθμίζουν σε αυστηρά πλαίσια τη διακύμανση των επιπέδων του LIP στο εσωτερικό των κυττάρων. Μέσω των μηχανισμών αυτών εξασφαλίζεται η απρόσκοπτη παροχή σιδήρου για τη σύνθεση πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η ασφαλής αποθήκευσή του σε συνθήκες οξειδωτικού στρες για την αποφυγή της τοξικότητάς του.

Κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας ομοιοστασίας του σιδήρου κατέχουν οι πρωτεΐνες ρύθμισης σιδήρου (Iron Regulating Protein 1 and 2, IRP1 και IRP2). Οι IRP1 και IRP2 είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία όσον αφορά την πρωτοταγή δομή τους [Rouault, 2006]. Ωστόσο, η πρωτεΐνη IRP2 περιέχει μια επιπλέον ομάδα 73 αμινοξέων κοντά στην αμινοτελική περιοχή της. Αρχικά, οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως «αισθητήρες» του διαθέσιμου σιδήρου στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως καθορίζουν σε επίπεδο

mRNA, είτε θετικά είτε αρνητικά, τη σύνθεση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου, όπως η φερριτίνη και ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 [Hentze et al., 2004; Fillebeen et al., 2005; Papanikolaou and Pantopoulos, 2005]. Απόρροια της δράσης αυτών των μηχανισμών είναι η αυστηρή ρύθμιση των επιπέδων του LIP στο κυτταρόπλασμα.

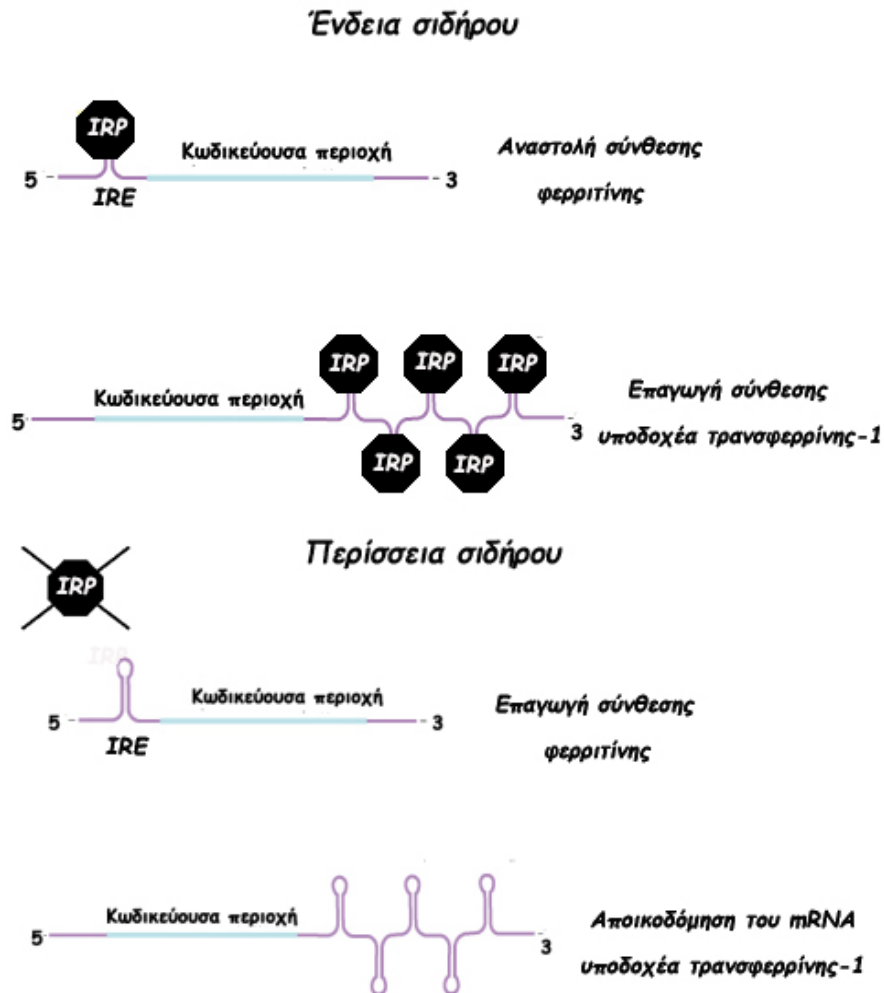
Η φερριτίνη και ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 αποτελούν δύο παραδείγματα πρωτεϊνών που κατέχουν κομβικό ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία του σιδήρου. Η έκφρασή τους ελέγχεται από τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου με έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις του mRNA τους με τις πρωτεΐνες IRPs. Συγκεκριμένα, στο 5' και 3' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής του mRNA της φερριτίνης και του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1 αντίστοιχα, περιέχονται «ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στο σίδηρο» (Iron Responsive Elements, IREs) που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες IRPs (εικόνα 13). Το mRNA της φερριτίνης περιέχει ένα IRE, ενώ το mRNA του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1 περιέχει πέντε IREs.



**Εικόνα 13.** Στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο (Iron Responsive Elements, IREs) στο 5' και 3' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής του mRNA της φερριτίνης και του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1, αντίστοιχα.

Σε συνθήκες ένδειας σιδήρου, η αλληλεπίδραση των IRPs με το IRE στο 5' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής του mRNA της φερριτίνης οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης του mRNA και ως εκ τούτου σε αναστολή της σύνθεσης της φερριτίνης (εικόνα 14). Αντίθετα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η αλληλεπίδραση των

IRPs με τα πέντε IREs στο 3' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής του mRNA του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1 έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του mRNA και την ακόλουθη αύξηση της μετάφρασης του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1, ώστε τα κύτταρα υπό αυτές τις συνθήκες να προσλάβουν μεγαλύτερες ποσότητες σιδήρου μέσω της τρανσφερρίνης [Muckenthaler et al., 2008; Recalcatti et al., 2010].



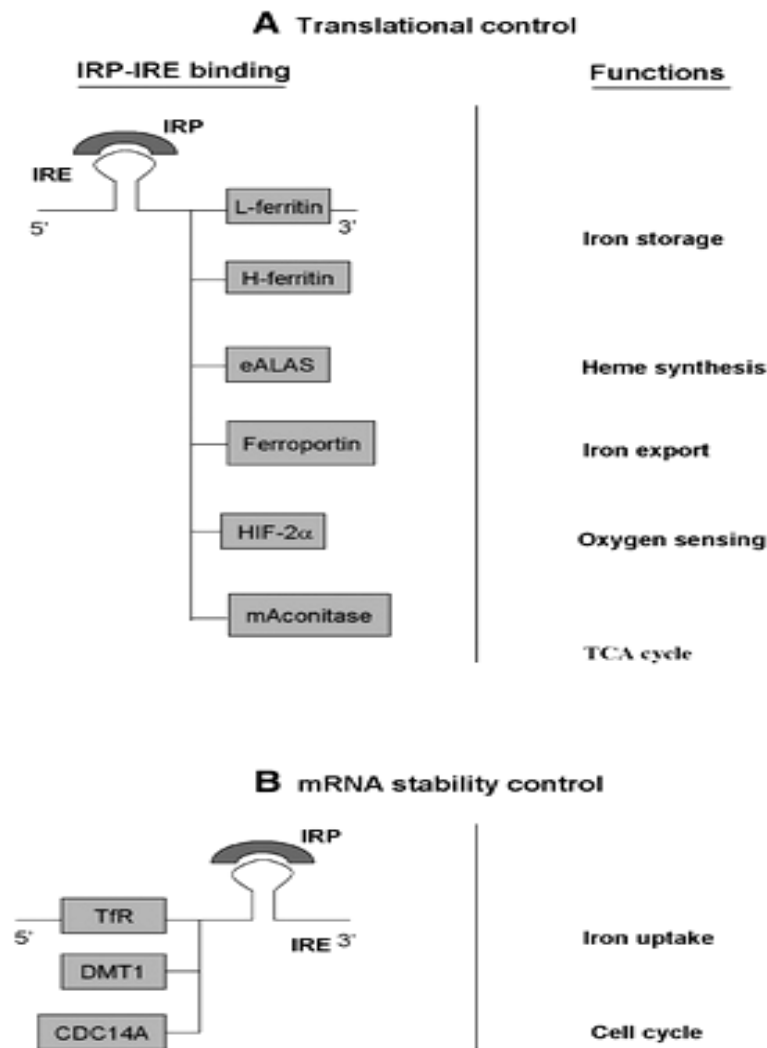
**Εικόνα 14.** Ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο μέσω του συστήματος αλληλεπίδρασης IRP-IRE σε συνθήκες ένδειας και περίσσειας σιδήρου.

Σε συνθήκες κορεσμού των κυττάρων με σίδηρο, οι πρωτεΐνες IRPs αδρανοποιούνται και δε δεσμεύονται στα IREs. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη IRP1 σε αυτές τις συνθήκες σχηματίζει ένα σύμπλοκο σιδήρου-θείου (4Fe-4S) που δεν της επιτρέπει να προσδεθεί στα IREs [Walden et al., 2006; Muckenthaler et al., 2008]. Έτσι, πραγματοποιείται κανονικά η μετάφραση του mRNA της φερριτίνης, ενώ το mRNA του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1 αποικοδομείται (εικόνα 14). Η απόκριση αυτή



οδηγεί από τη μια πλευρά σε αναστολή της περαιτέρω πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα μέσω της τρανσφερρίνης και από την άλλη προάγει την αποθήκευση του ενδοκυττάριου σιδήρου στην αυξημένη φερριτίνη, ώστε να αποφευχθούν οι τοξικές του επιδράσεις. Όσον αφορά την IRP2, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και παρουσιάζει σημαντική ομολογία με την IRP1 όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα σιδήρου-θείου και η αδρανοποίησή της πραγματοποιείται μέσω αποικοδόμησής της στο πρωτεάσωμα [Rouault, 2006].

Εκτός από τη ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα τρανσφερρίνης και της φερριτίνης, το σύστημα αλληλεπίδρασης IRP-IRE, σύμφωνα με μελέτες, φαίνεται ότι εμπλέκεται και στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων πρωτεϊνών που είναι εξίσου σημαντικές για την ομοιοστασία του σιδήρου [Johansson and Theil, 2002; Mok et al., 2004; Recalcatti et al., 2010] (εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην ομοιοστασία του σιδήρου μέσω του συστήματος αλληλεπίδρασης IRP-IRE.

Για παράδειγμα, το mRNA της πρωτεΐνης μεταφοράς δισθενών μετάλλων DMT1 και το mRNA της φερροπορτίνης περιέχουν ένα IRE στο 3' και 5' άκρο της μη μεταφράσιμης περιοχής τους, αντίστοιχα (εικόνα 15). Σε συνθήκες ένδειας σιδήρου, η αλληλεπίδραση των IRPs με τα IREs επιτρέπει αφενός μεν τη σταθεροποίηση του mRNA της πρωτεΐνης DMT1 και την ακόλουθη αύξηση της έκφρασής του [Mackenzie B. and Garrick MD., 2005; Wallander ML., 2006] και αφετέρου δε την αναστολή της μετάφρασης του mRNA της φερροπορτίνης και ως εκ τούτου την αναστολή της σύνθεσής της στα ηπατοκύτταρα, τα εντεροκύτταρα και τα μακροφάγα [Lymboussaki A. et al., 2003]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το σύστημα αλληλεπίδρασης IRP-IRE σχετίζεται και με τη ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών που δεν εμπλέκονται άμεσα στην ομοιοστασία του σιδήρου (εικόνα 15). Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών αποτελούν η πρωτεΐνη eALAS (erythroid 5-aminolevulinate synthase) που συμμετέχει στη σύνθεση της αίμης, ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας-1 (Hypoxia Inducible Factor-1, HIF-1) που συμμετέχει στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του οξυγόνου, το ένζυμο mAconitase που εμπλέκεται στον κύκλο του Krebs και η τυροσινική φωσφατάση CDC14A (Dual specificity protein phosphatase) που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο.

### **1.5. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και διατροφή**

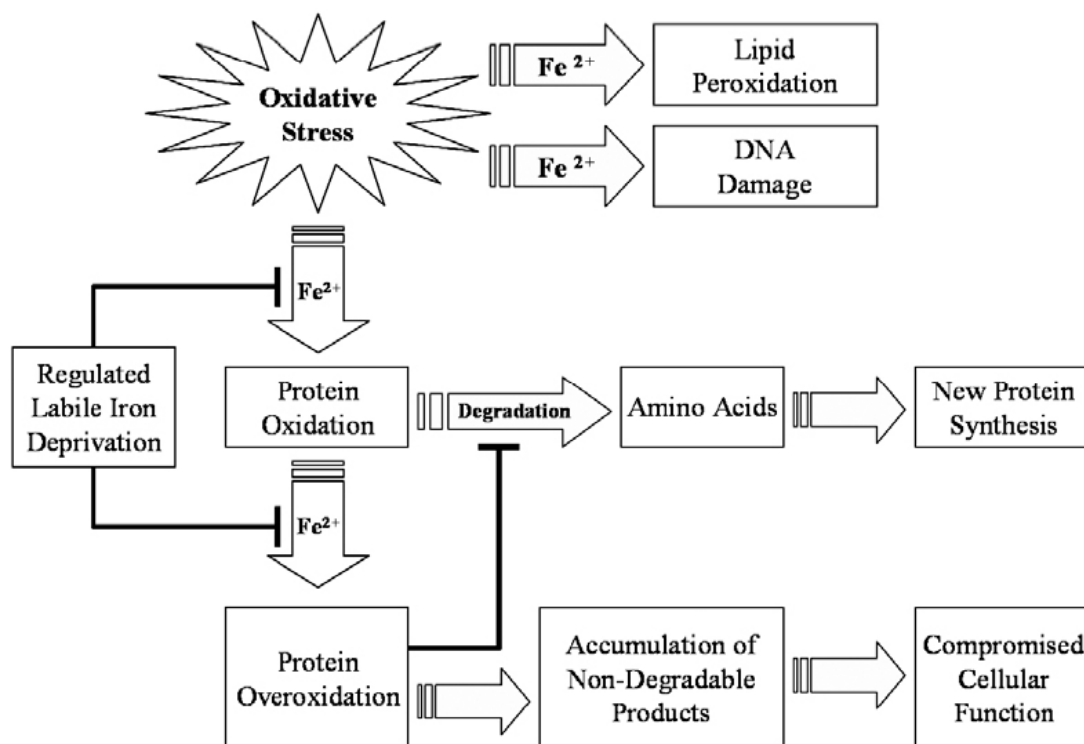
Ένας μεγάλος αριθμός σύγχρονων ερευνητικών εργασιών πραγματεύεται τις ευεργετικές επιδράσεις της μεσογειακής διαίτας τόσο στην επιβίωση [Trichopoulou et al., 2005] και τη γήρανση [Battino and Ferreiro, 2004] όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις [Lorgeril and Salen, 2000; Ferria and Grassib, 2003; Panagiotakos et al., 2004], ο καρκίνος [Martinez-Gonzalez and Estruch, 2004], ο σακχαρώδης διαβήτης [Biesalski, 2004], η αθηροσκλήρωση [Kok and Kromhout, 2004] και η νόσος Αλτσχάιμερ [Steele et al., 2006]. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της μεσογειακής διαίτας αποδίδονται κυρίως στα διάφορα συστατικά των τροφίμων που περιλαμβάνονται σε αυτή. Η ανάλυση των συστατικών αυτών και η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης καταδεικνύουν την πιθανότητα οι ευεργετικές τους επιδράσεις να οφείλονται στο μεγάλο αριθμό φαινολικών ή άλλων συστατικών (π.χ. φλαβονοειδή, καροτενοειδή κ.ά.) που αυτά περιέχουν [Stahl and Sies, 1996; Johnson, 2002; Rao and Rao, 2004]. Ωστόσο, μέσα

από εκτενείς μελέτες του εργαστηρίου μας έχει καταστεί φανερό ότι η ευεργετική δράση των συστατικών αυτών οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη συμμετοχή του στην αντίδραση Fenton και την ακόλουθη παραγωγή των δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου [Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Nousis et al., 2006]. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων ενάντια στις βλάβες που προκαλεί η έκθεση των κυττάρων σε  $H_2O_2$  είναι ευθέως ανάλογη με την ικανότητά τους να δεσμεύουν ενδοκυττάρια ιόντα σιδήρου. Επιπλέον, έχει διερευνηθεί η επίδραση των φλαβονοειδών στην απόπτωση που προκαλείται από το  $H_2O_2$ . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι η ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου οδηγεί στην προστασία των κυττάρων ενάντια στην απόπτωση που προκαλείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

#### **1.6. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και γήρανση**

Οι οργανισμοί κατά τη διάρκεια της ζωής τους υφίστανται μη αντιστρεπτές, επιζήμιες μεταβολές στα κύτταρά τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γήρανση και αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία ελέγχεται από ένα περίπλοκο σύστημα μοριακών μηχανισμών. Ανάμεσα στην πληθώρα των θεωριών που έχουν προταθεί για την εξήγηση της μοριακής βάσης αυτής της διαδικασίας, τον πυρήνα του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας έχει συγκεντρώσει η «θεωρία των ελεύθερων ριζών για τη γήρανση», η οποία έχει ερευνηθεί εκτενώς και βασίζεται σε ένα τεράστιο όγκο μελετών [Muller FL. et al., 2007]. Η θεωρία αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά πριν από 50 χρόνια από τον Denham Harman και σύμφωνα με αυτή οι δραστικές ελεύθερες ρίζες, που σχηματίζονται ενδογενώς κατά τη διάρκεια φυσιολογικών μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες χρησιμοποιείται οξυγόνο, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης [Harman, 1956]. Αν και η άποψη αυτή έχει αναθεωρηθεί αρκετές φορές [Harman, 1972; Sohal and Weindruch, 1996], η κεντρική της ιδέα περί της προοδευτικά αθροιζόμενης καταστροφικής δράσης των ελεύθερων ριζών σε βασικά κυτταρικά συστατικά κατά τη διάρκεια της γήρανσης παραμένει η ίδια μέχρι σήμερα [Rattan SI., 2006]. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο σχηματισμός των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών

προϋποθέτει τη διαθεσιμότητα των ιόντων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση Fenton κατά την οποία τα σχετικά ανενεργά υπεροξείδια μετατρέπονται στις δραστικές υπεροξειδικές ρίζες [Galaris and Pantopoulos, 2008]. Με τον τρόπο αυτό, κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, η παρουσία αυξημένων επιπέδων του LIP οδηγεί αφενός μεν στην αύξηση του ρυθμού οξείδωσης των βασικών κυτταρικών συστατικών (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA) και αφετέρου δε σε μια επιπλέον οξείδωση των ήδη οξειδωμένων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδωμένων προϊόντων που δε δύναται να υποστούν κάποια άλλη τροποποίηση (εικόνα 16). Ο σχηματισμός των υπεροξειδωμένων προϊόντων έχει ως συνέπεια αρχικά την αναστολή της λειτουργίας των κυτταρικών συστημάτων αποικοδόμησης και ακολούθως τη συσσώρευσή τους στο εσωτερικό των κυττάρων.



**Εικόνα 16.** Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών οξείδωσης που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της γήρανσης και η πιθανή εμπλοκή του σιδήρου σε αυτές.

Για το σκοπό αυτό, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς που ρυθμίζουν σε αυστηρά πλαίσια τη διακύμανση των επιπέδων του LIP στο εσωτερικό των κυττάρων, ώστε να αποφεύγονται οι τοξικές επιπτώσεις του. Κατά

συνέπεια, η διατήρηση των επιπέδων του LIP σε σχετικά σταθερά επίπεδα θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού συσσώρευσης των οξειδωμένων συστατικών και κατ' επέκταση μια έμμεση επίδραση στη διαδικασία της γήρανσης [Polla et al., 2003; Sullivan, 2004]. Πράγματι, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η διατήρηση του σιδήρου σε σχετικά σταθερά επίπεδα έχει ευεργετική επίδραση στη βιωσιμότητα του *Caenorhabditis elegans* και της *Drosophila* [Xu et al., 2010]. Με τον τρόπο αυτό, δίνεται ένα νέο έναυσμα για τη διερεύνηση του ρόλου του σιδήρου στη μακροζωία.

### **1.7. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και παθολογικές καταστάσεις**

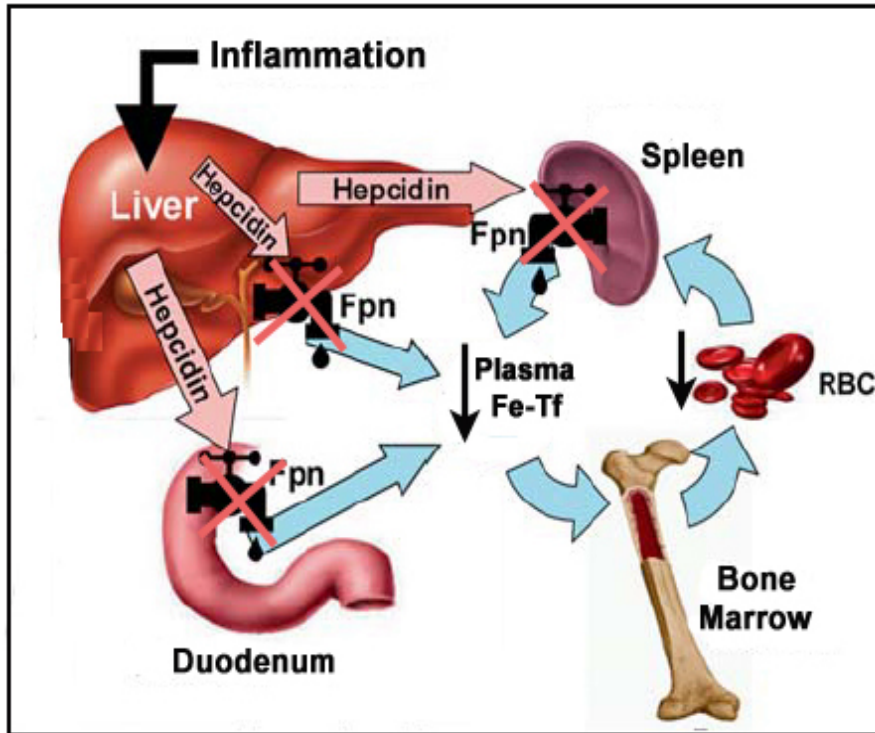
Αρκετές ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν πως ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες εμπλέκονται σε μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα [Korantzopoulos P. et al., 2003; Kruszewski, 2004; Eleuteri E. et al., 2009], η αθηρωμάτωση [Gackowski et al., 2001; Yuan XM. and Li W., 2008], η επανοξυγόνωση μετά από ισχαιμία [Galaris et al., 2006; Chevion M., 2008], οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις [Weiss and Goodnough, 2005], οι νόσοι Parkinson's και Alzheimer's [Zhou et al., 2001; Gregory and Hayflick, 2005; Hayflick, 2006; Youdim, 2008] κ.ά. Ακόμη, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε συνεργασία με το σίδηρο εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα (signal transduction) ως δευτεροί διαμεσολαβητές και ως εκ τούτου κατέχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης [Wu KJ. et al., 1999], στην καρκινογένεση [Richardson D.R. et al., 2008; Galaris et al., 2008], καθώς και στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου [Yu Z. et al., 2003; Tenopoulou et al., 2005; Barbouti et al., 2007].

#### **1.7.1. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και Αναιμία Χρονίας Νόσου**

Οι αναιμίες χρονίας νόσου (AXN), με εξαίρεση τη σιδηροπενική αναιμία, αποτελούν τις πλέον συχνές στην κλινική πράξη και παράλληλα τις πλέον δυσχερώς αντιμετωπίσιμες αναιμίες στον άνθρωπο [Lee, 1983; Andrews, 2008]. Αρχικά,

συσχετίζονταν με μια σειρά φλεγμονωδών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων, των ρευματολογικών νοσημάτων και του καρκίνου. Πιο πρόσφατα όμως, σε συνδυασμό με την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσής τους, έγινε φανερό ότι σχετίζονται με ένα πιο ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων [Means, 2003]. Κατά συνέπεια, σύνδρομα παρόμοια ή και ίδια με τις AXN έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας [Rodríguez et al., 2001], σε μετεγχειρητικές καταστάσεις [van Ipersen et al., 1998] και σε περιπτώσεις εκτεταμένων τραυματισμών [Vincent et al., 2002]. Το γεγονός ότι οι αλλαγές στο μεταβολισμό του σιδήρου ήταν παρόμοιες στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις υποδηλώνει την ύπαρξη μιας κοινής παθοφυσιολογικής διαδικασίας.

Ο ακριβής έλεγχος της ομοιοστασίας του σιδήρου, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο, πραγματοποιείται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που έχουν αναπτυχθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, σε περιπτώσεις που ο σίδηρος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί βλαπτικά για τον οργανισμό, όπως σε συνθήκες φλεγμονής ή λοίμωξης, αναστέλλεται προσωρινά η διαθεσιμότητα του σιδήρου. Η αναστολή αυτή για μεγάλο χρονικό διάστημα δημιουργεί δυσάρεστες επιπλοκές με κυριότερη την ανάπτυξη AXN. Η ανακάλυψη του πεπτιδίου της ηπατιδίνης την τελευταία δεκαετία και η κατανόηση της αλληλεπίδρασής του με τη φερροπορτίνη, που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μεσολαβεί στην έξοδο του σιδήρου από μια σειρά κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων, φαίνεται να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη της AXN [Ganz, 2003; 2006]. Η παρατηρούμενη σημαντική μείωση των επιπέδων της φερροπορτίνης στις πλασματικές μεμβράνες των μακροφάγων, των ηπατοκυττάρων και των εντεροκυττάρων σε περιπτώσεις AXN προκαλείται από τα αυξημένα επίπεδα ηπατιδίνης στο αίμα κατά τη διάρκεια φλεγμονής ή από αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών (π.χ. IL-6) [Ganz, 2003; 2006] (εικόνα 17). Άμεση συνέπεια των προηγούμενων είναι τα χαμηλά επίπεδα σιδήρου στον ορό, ο χαμηλός κορεσμός τρανσφερρίνης και ο μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων στον ορό του αίματος των ασθενών με AXN παρά το γεγονός της ύπαρξης επαρκών ποσοτήτων σιδήρου σε ιστούς όπως το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και το ήπαρ. Κατά συνέπεια, η συσσώρευση του σιδήρου στα παραπάνω κύτταρα όχι μόνο συνυπάρχει με την αναιμία αλλά αποτελεί και την κύρια αιτία για την εκδήλωσή της [Weiss and Goodnough, 2005].



Εικόνα 17. Η αλληλεπίδραση ηπατιδίνης-φερροπορτίνης (Hepcidin-Fpn) καθορίζει τη διαθεσιμότητα του σιδήρου στον ορό του αίματος ασθενών AXN.

Η αιτιολογική θεραπεία της AXN προϋποθέτει την εκρίζωση του αιτίου που κινεί τον παθοφυσιολογικό της μηχανισμό, γεγονός πρακτικά ανέφικτο στις περισσότερες περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό, η θεραπευτική επιλογή στην αντιμετώπιση της AXN συνίσταται συνήθως στη χορήγηση σκευασμάτων διέγερσης της ερυθροποίησης (ESA, Erythropoiesis-Stimulating-Agents), καθώς οι ασθενείς έχουν αναιμία με χαρακτηριστικά χρόνιας νόσου. Βασικό συστατικό σε αυτά τα σκευάσματα είναι η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη ή παράγωγα της ερυθροποιητίνης. Εντούτοις, έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στην ερυθροποιητίνη αν και υπάρχουν ικανοποιητικές ποσότητες σιδήρου στον οργανισμό. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνίσταται η επιπρόσθετη ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου [Locatelli et al., 2004; K/DOQI, 2006; Silverberg et al., 2000; Silverberg et al., 2001; Mancini et al., 2003; Palazzuoli et al., 2007; Ponikowski et al., 2007; van Veldhuisen et al., 2007; Ghali et al., 2008].

Ωστόσο, αν και η χορήγηση της ερυθροποιητίνης αποτελεί τη βασική θεραπευτική προσέγγιση της AXN, έχουν δημιουργηθεί αρκετά ερωτηματικά όσον αφορά την ασφάλεια της χορήγησης διεγερτών της ερυθροποίησης σε περιπτώσεις

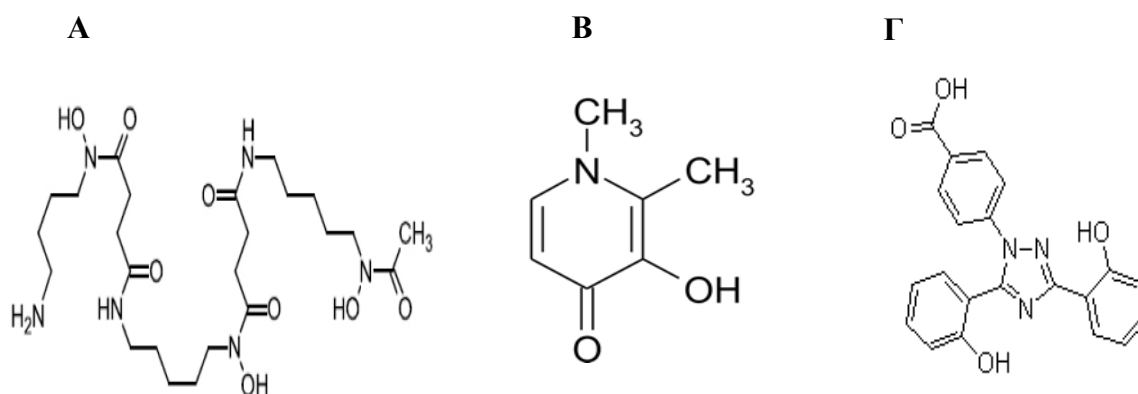
AXN. Πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο έχουν δείξει ότι η χορήγηση σκευασμάτων διέγερσης της ερυθροποιητίνης για τη διόρθωση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη στα φυσιολογικά επίπεδα είχε δυσάρεστες συνέπειες για την υγεία των ασθενών αυτών [Besarab et al., 1998; Druke et al., 2006; Singh et al., 2006]. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ να προτείνει τη διόρθωση της αιμοσφαιρίνης σε επίπεδα όχι υψηλότερα των 10-12 g/dl [Food and Drug Administration, 2007]. Ο ακριβής μηχανισμός για τις βλαπτικές επιπτώσεις των διεγερτών της ερυθροποίησης δεν είναι γνωστός προς το παρόν. Υποθετικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί εμπλέκουν την αύξηση της γλοιότητας του αίματος, τη μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου καθώς και αλλαγές στα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα κύτταρα των αγγείων, της ενδοθηλίνης-1 και της ενεργότητας του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [Rodrigue et al., 2003; Eggena et al., 1991]. Άλλες μελέτες αποδίδουν την αρνητική δράση των σκευασμάτων διέγερσης της ερυθροποίησης σε ενέργειες της ερυθροποιητίνης που δε σχετίζονται αποκλειστικά με την ερυθροποίηση, καθώς υποδοχείς της έχουν αναφερθεί και σε μία σειρά μη-ερυθροποιητικών ιστών [Parsa et al., 2003; Calvillo et al., 2003; Westenbrink et al., 2007]. Εντούτοις, είναι πιθανό οι βλαπτικές επιπτώσεις από τη χορήγηση διεγερτών ερυθροποίησης να οφείλονται όχι στην ερυθροποιητίνη αλλά στην περίσσεια του χορηγούμενου σιδήρου, η οποία μπορεί να αποβεί και δυνητικά επικίνδυνη κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες λόγω της ικανότητας του σιδήρου να καταλύει τη δημιουργία δραστικών ελεύθερων ριζών [Sullivan, 2007; Galaris and Pantopoulos, 2008; Galaris et al., 2008].

Με βάση τα προηγούμενα δεδομένα γίνεται φανερό ότι θα είχε ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον η κινητοποίηση των ενδογενών αποθεμάτων σιδήρου που έχουν συσσωρευτεί στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος ασθενών με AXN. Με τον τρόπο αυτό, θα αποφεύγονταν η επιπρόσθετη χορήγηση ενδοφλέβιου σιδήρου και κατά συνέπεια οι τοξικές της επιπτώσεις. Η κινητοποίηση αυτή θα μπορούσε πιθανόν να πραγματοποιηθεί με τη χρήση εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων που έχουν την ικανότητα α) να διαχέονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, β) να δεσμεύουν το διαθέσιμο ενδοκυττάριο σίδηρο (labile iron pool), γ) να διαχέονται εκ νέου εκτός του κυττάρου ως σύμπλοκο με το σίδηρο παρακάμπτοντας το εμπόδιο φερροπορτίνης-ηπατιδίνης και τέλος δ) να αποδίδουν το



σίδηρο στην τρανσφερρίνη του ορού για την περαιτέρω αναδιανομή του στις ερυθροβλάστες του μυελού των οστών και τη δημιουργία νέων ερυθροκυττάρων.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων, που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην κλινική πράξη, αποτελούν η δεσφериοξαμίνη (Desferrioxamine, DFO), η δεφεριπρόνη (Deferiprone, L1) και η δεφερασιρόξη (Deferasirox, ICL-670) (εικόνα 18). Οι ενώσεις αυτές, αν και χρησιμοποιούνται κατ'εξοχήν για τη θεραπεία της υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο έχοντας ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του σιδήρου από τον οργανισμό, θα μπορούσαν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά για την κινητοποίηση του ενδογενούς σιδήρου και την ακόλουθη απόδοσή του στην τρανσφερρίνη. Με τον τρόπο αυτό, τα ενδογενή αποθέματα σιδήρου θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού.



**Εικόνα 18.** Δομή των χημικών ενώσεων δεσφериοξαμίνη (Α), δεφεριπρόνη (Β) και δεφερασιρόξη (Γ).

Η δεσφериοξαμίνη ήταν η πρώτη φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την αποσιδήρωση μετά από μεταγγίσεις αίματος σε ασθενείς με μεσογειακή αναιμία (1975). Αποτελεί ένα χηλικό παράγοντα που δεσμεύει το σίδηρο σε αναλογία 1:1 και αποβάλλεται ικανοποιητικά με τα ούρα και τη χολή. Χορηγείται παρεντερικά είτε ενδοφλέβια είτε με συνεχή υποδόρια έγχυση. Η δεφεριπρόνη, από την άλλη πλευρά, ήταν ο πρώτος χηλικός παράγοντας που χορηγήθηκε από το στόμα. Δεσμεύει το σίδηρο σε αναλογία 3:1 και αποβάλλεται από τον οργανισμό με τα ούρα. Τέλος, ένας νεότερος χηλικός παράγοντας που χορηγείται από το στόμα είναι η δεφερασιρόξη (ICL670), η οποία δεσμεύει το σίδηρο σε αναλογία 2:1.

### 1.7.2. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) και Χρόνια Καρδιακή Ανεπάρκεια

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί το τελικό στάδιο αρκετών καρδιακών νόσων και ορίζεται ως ένα σύνθετο παθοφυσιολογικό σύνδρομο, κατά το οποίο κάποια ανωμαλία της καρδιακής λειτουργίας ευθύνεται για την αδυναμία της καρδιάς, ως αντλία να εξωθήσει αίμα σε ρυθμό που να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του μεταβολισμού των ιστών του σώματος. Καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται ακόμη και όταν το αίμα προωθείται κανονικά στους ιστούς, αλλά υπό καθεστώς αυξημένων πιέσεων στην καρδιά. Επιδημιολογικά, εκτιμάται ότι η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνεται συνεχώς στο δυτικό κόσμο με το 10-20% του ηλικιωμένου πληθυσμού να πάσχει από καρδιακή ανεπάρκεια. Θεωρείται σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας, καθώς σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και μειωμένη επιβίωση και για το λόγο αυτό αποτελεί αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας [McMurray, 2010].

Η καρδιακή ανεπάρκεια, ανάλογα με την κοιλία στην οποία εντοπίζεται η δυσλειτουργία, διακρίνεται σε: α) αριστερή, β) δεξιά και γ) ολική καρδιακή ανεπάρκεια. Ακόμη, το σύνδρομο της καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να ταξινομηθεί με βάση την αιτία πρόκλησής της σε: α) ισχαιμική και β) μη ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια. Η ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια εμφανίζεται σε περιπτώσεις στεφανιαίας νόσου και ιδίως εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ η μη ισχαιμική σε περιπτώσεις διατακτικής καρδιομυοπάθειας, αρτηριακής υπέρτασης, βαλβιδοπάθειας κ.ά. Επιπρόσθετα, ανάλογα με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό που προκαλεί την καρδιακή ανεπάρκεια, αυτή διακρίνεται σε: α) συστολική καρδιακή ανεπάρκεια, κατά την οποία η καρδιά αδυνατεί να συσταλεί και να στείλει αίμα στο υπόλοιπο σώμα με αποτέλεσμα να παρατηρείται μειωμένο κλάσμα εξώθησης (<50-55%) και β) διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια, κατά την οποία η καρδιά αδυνατεί να διασταλεί ικανοποιητικά, ώστε να πληρωθούν οι κοιλίες της με αίμα με αποτέλεσμα να διατηρείται το κλάσμα εξώθησης (>50-55%). Ως κλάσμα εξώθησης (Ejection Fraction, EF) ορίζεται το ποσοστό του τελοδιαστολικού όγκου που εξωθείται από την αριστερή κοιλία σε κάθε συστολή. Φυσιολογικά είναι 55-75%, ενώ σε περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας είναι μικρότερο από 50-55%.

Για την αξιολόγηση της βαρύτητας της καρδιακής ανεπάρκειας ανάλογα με τα συμπτώματα (κόπωση, δύσπνοια) και την ανοχή των ασθενών στην άσκηση, συνήθως

χρησιμοποιείται η ταξινόμηση της Καρδιολογικής Εταιρίας της Νέας Υόρκης (New York Heart Association, NYHA), που φαίνεται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Λειτουργική ταξινόμηση καρδιακής ανεπάρκειας κατά NYHA (New York Association).**

<i>Στάδιο I</i>	Κανένας περιορισμός και κανένα σύμπτωμα στη συνήθη φυσική δραστηριότητα.
<i>Στάδιο II</i>	Ήπιος περιορισμός στη συνήθη φυσική δραστηριότητα με εμφάνιση συμπτωμάτων σε αυτή.
<i>Στάδιο III</i>	Έντονος περιορισμός σε πολύ μικρή φυσική δραστηριότητα με εμφάνιση συμπτωμάτων σε αυτή. Κανένα σύμπτωμα σε κατάσταση ηρεμίας.
<i>Στάδιο IV</i>	Συμπτώματα σε κατάσταση ηρεμίας. Αδυναμία εκτέλεσης οποιασδήποτε δραστηριότητας χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων.

Η βαρύτητα και η εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας, σύμφωνα με μελέτες, σχετίζονται με την παρουσία αυξημένου οξειδωτικού στρες [Korantzopoulos P. et al., 2003; Giordano FJ. et al., 2005; Eleuteri E. et al., 2009]. Ο καρδιακός ιστός αποτελεί έναν ιδιαίτερα ευπαθή ιστό, καθώς χαρακτηρίζεται από μικρό βαθμό κυτταρικής διαίρεσης και έντονη λειτουργικότητα σε όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αρκετές πιθανότητες να υποβληθεί σε έντονη οξειδωτική καταπόνηση [Lefter and Granger, 2000]. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδα ουσιών, που αποτελούν δείκτες οξειδωτικού στρες, στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια συσχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου [Braunwald E. 2008; Radovanovic S. et al., 2008; Eleuteri E. et al., 2009; Trachtenberg BH. and Hare JM., 2009; Nagayoshi Y. et al., 2009; Amir O. et al., 2009]. Ωστόσο, ως δείκτες οξειδωτικού στρες χρησιμοποιούνται τα προϊόντα της αντίδρασης των ελεύθερων ριζών με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδαάνθρακες και το DNA. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου κάτω από

συνθήκες οξειδωτικού στρες αντιδρούν αδιακρίτως με οτιδήποτε βρεθεί κοντά τους τη στιγμή του σχηματισμού τους, προκαλώντας τροποποιήσεις σε βασικά κυτταρικά συστατικά (π.χ. λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA κ.α) προάγοντας με τον τρόπο αυτό είτε τη δυσλειτουργία είτε το θάνατο των κυττάρων του μυοκαρδίου. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή προϊόντων λιπιδιακής υπεροξειδωσης και μείωση των αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [Ide et al., 2001; Tsutsui et al., 2004; Sheeran and Pepe, 2006]. Όμως, κομβικό ρόλο στη δημιουργία των ελεύθερων ριζών, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατέχει ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος, ο οποίος δύναται να αποτελέσει ένα νέο άμεσο δείκτη οξειδωτικού στρες, καθώς η διαθεσιμότητά του ή μη καθορίζει την ενδοκυττάρια παραγωγή των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση το μέγεθος των βλαπτικών επιπτώσεών τους. Συγκεκριμένα, ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος καταλύει τη μετατροπή του σχετικά ανενεργού υπεροξειδίου του υδρογόνου στις εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου [Ide T. et al., 2000; Barbouti et al., 2001]. Ως εκ τούτου, καθώς ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος εμπλέκεται άμεσα στη δημιουργία του οξειδωτικού στρες που παρατηρείται στην καρδιακή ανεπάρκεια, είναι πολύ πιθανό να διαδραματίζει βασικό ρόλο και στη βαρύτητα και στην εξέλιξη της συγκεκριμένης νόσου. Για το λόγο αυτό, στους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι μηχανισμοί, ώστε τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου να διατηρούνται σχετικά σταθερά στο εσωτερικό των κυττάρων [McCord, 2004; Pantopoulos, 2004; Richardson, 2005]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης, η δέσμευση του LIP σε καρδιομυοκύτταρα μετά τη χορήγηση δεσφεριοξαμίνης οδηγεί σε σημαντική μείωση του παρατηρούμενου οξειδωτικού στρες και σε αυξημένη βιωσιμότητα των κυττάρων [Omiya S. et al., 2009]. Εντούτοις, δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διερεύνηση του ρόλου του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου στην καρδιακή ανεπάρκεια.

## 1.8. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες και του σιδήρου στον οργανισμό

### 1.8.1. Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες

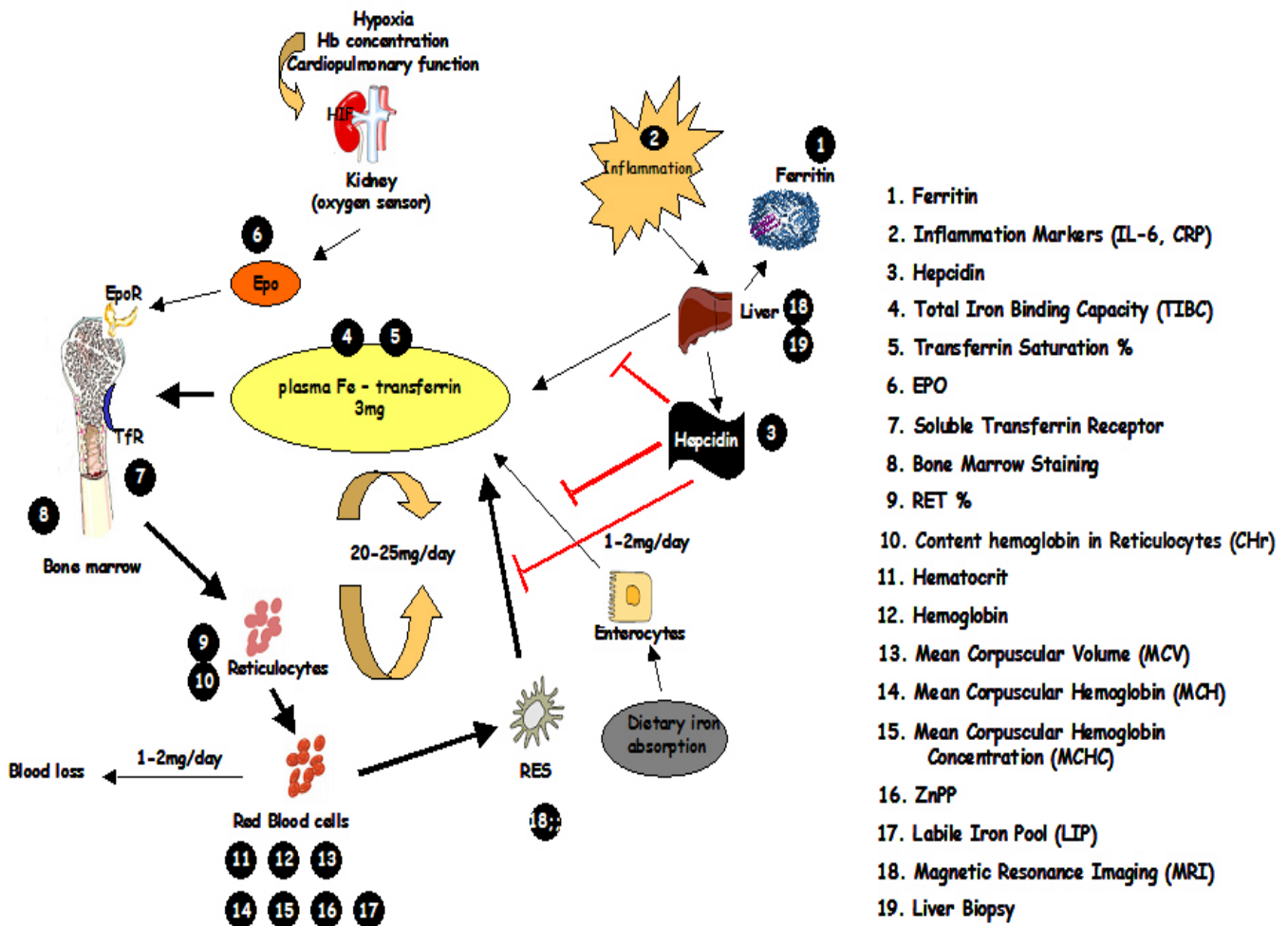
Η άμεση ανίχνευση των ελεύθερων ριζών είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί λόγω της μικρής συγκέντρωσης και της αυξημένης δραστικότητάς τους [Himmelfarb, 2005]. Για το λόγο αυτό, ως δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιούνται τα σχετικά σταθερά τελικά προϊόντα αντίδρασης των δραστικών ελεύθερων ριζών με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και το DNA.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ευαίσθητων δεικτών που αφορούν τη λιπιδιακή υπεροξειδωση αποτελούν η μηλονική διαλδεϋδη (MDA), η 4-υδροξυνενάλη (4-HNE) και τα F2 ισοπροστάνια. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών στρέφεται στην ανίχνευση της οξειδωτικά τροποποιημένης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) καθώς είναι γνωστή η συσχέτισή της με την αθηρογένεση. Οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες του πλάσματος (π.χ. οξείδωση θειολών, καρβονύλια κ.ά.) και αμινοξέα (π.χ. 3-χλωροτυροσίνες, διτυροσίνες, 3-νιτροτυροσίνες, κ.ά.) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως ευαίσθητοι δείκτες αυξημένου οξειδωτικού στρες. Μάλιστα, ο σχετικά μεγάλος χρόνος ημιζωής των πρωτεϊνών, ο εύκολος προσδιορισμός τους, αλλά και η καλή γνώση των βιοχημικών δρόμων που προάγουν την οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων βοηθούν στην πιο λεπτομερή μελέτη του φαινομένου του οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση των λιπιδίων του πλάσματος. Ακόμη, όσον αφορά την οξειδωτική τροποποίηση του DNA ένας ευαίσθητος δείκτης οξειδωτικού στρες είναι η 8 υδροξυ 2 δεοξυγουανίνη.

Τέλος, για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μελετάται και η ενεργότητα βασικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών συστημάτων (π.χ. υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση), αλλά και τα επίπεδα αρκετών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ενώσεων (π.χ. βιταμίνη C, βιταμίνη E, ουρικό οξύ κ.ά.).

### 1.8.2. Δείκτες εκτίμησης των επιπέδων του σιδήρου στον οργανισμό

Στην κλινική πράξη τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό εκτιμώνται με βάση το συνδυασμό μιας πληθώρας εργαστηριακών εξετάσεων (εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των δεικτών που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό.

Αυτές περιλαμβάνουν τη μέτρηση του αιματοκρίτη, της αιμοσφαιρίνης, του μέσου όγκου ερυθροκυττάρων (MCV), της μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (MCH), της μέσης πυκνότητας αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (MCHC), της πρωτοπορφυρίνης των ερυθροκυττάρων (FEP), της πρωτοπορφυρίνης του ψευδαργύρου (ZnPP), του υποδοχέα της τρανσφερίνης, του σιδήρου στον ορό του αίματος, της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας πλάσματος (TIBC), του κορεσμού της τρανσφερίνης και της φερριτίνης. Επίσης, μετράται το ποσοστό των

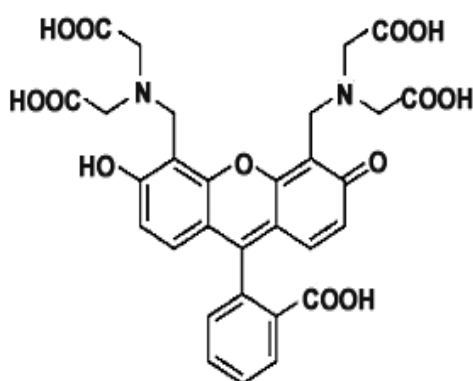
δικτυοερυθροκυττάρων (%RET) και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (CHr) σε αυτά, ώστε να επιτυγχάνεται μια έγκαιρη εκτίμηση των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό, καθώς τα δικτυοερυθροκύτταρα αποτελούν πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων. Σε συνθήκες ένδειας σιδήρου του ορού η βιοψία μυελού των οστών αποτελεί έναν άμεσο δείκτη των αποθεμάτων σιδήρου στον οργανισμό, ενώ σε συνθήκες υπερφόρτωσης η βιοψία ήπατος, η αξονική (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) ήπατος εκτιμούν τα αυξημένα επίπεδα σιδήρου.

Αν και οι συγκεκριμένοι δείκτες παρέχουν μια εικόνα για τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό, εντούτοις δεν αντιπροσωπεύουν την οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του σιδήρου που συμμετέχει στην αντίδραση Fenton, αποτέλεσμα της οποίας είναι η δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών και οι βλαπτικές επιπτώσεις αυτών σε βασικά κυτταρικά συστατικά. Για το λόγο αυτό, θα ήταν ωφέλιμο να μπορούν να εκτιμηθούν άμεσα τα επίπεδα του LIP.

### **1.8.3. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP)**

Οι πρώτες προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κυτταρικές καλλιέργειες είχαν ως βασική αρχή τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, αναπτύχθηκαν μέθοδοι που περιελάμβαναν την κλασμάτωση κυτταροπλασματικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους με στόχο τη χημική ταυτοποίηση συμπλόκων που περιείχαν σίδηρο [Weaver J. et al., 1989]. Ακόμη, έγιναν μελέτες που αφορούσαν τον προσδιορισμό της «ταυτότητας» του LIP μετά από την προσθήκη χηλικών παραγόντων, όπως της δεσφεριοξαμίνης (desferrioxamine, DFO), σε δείγματα ομογενοποιημένων ιστών. Σύμφωνα με αυτές, οι χηλικοί παράγοντες είχαν τη δυνατότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το σίδηρο, τα οποία ήταν ανιχνεύσιμα με τη μέθοδο του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance-EPR) [Kozlov et al., 1992]. Ωστόσο, όλες αυτές οι μέθοδοι προϋποθέτουν την καταστροφή του κυττάρου. Έτσι, η ανίχνευση των πραγματικών επιπέδων του LIP δεν ήταν εφικτή καθώς μετά τη ρήξη της μεμβράνης υπήρχε ανακατανομή του σιδήρου μεταξύ των διαφόρων διαμερισμάτων του κυττάρου. Η δυσκολία αυτή έθεσε υπό αμφισβήτηση την ύπαρξη του LIP από πολλούς ερευνητές.

Πιο πρόσφατες μελέτες για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε ανέπαφα κύτταρα επικεντρώθηκαν στη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων χηλικών παραγόντων με δυνατότητα φθορισμού [Epsztejn et al., 1997; Kakhlon O. and Cabantchik ZI., 2002]. Οι παράγοντες αυτοί έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να λειτουργούν ως «ανιχνευτές» των επιπέδων του LIP χωρίς να επηρεάζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται εκτενώς την τελευταία δεκαετία για τον προσδιορισμό των επιπέδων του LIP, κυρίως σε κύτταρα σε καλλιέργειες, αποτελεί η καλσεΐνη [Cabantchik ZI et al., 2002; Glickstein H. et al., 2005] (εικόνα 20).

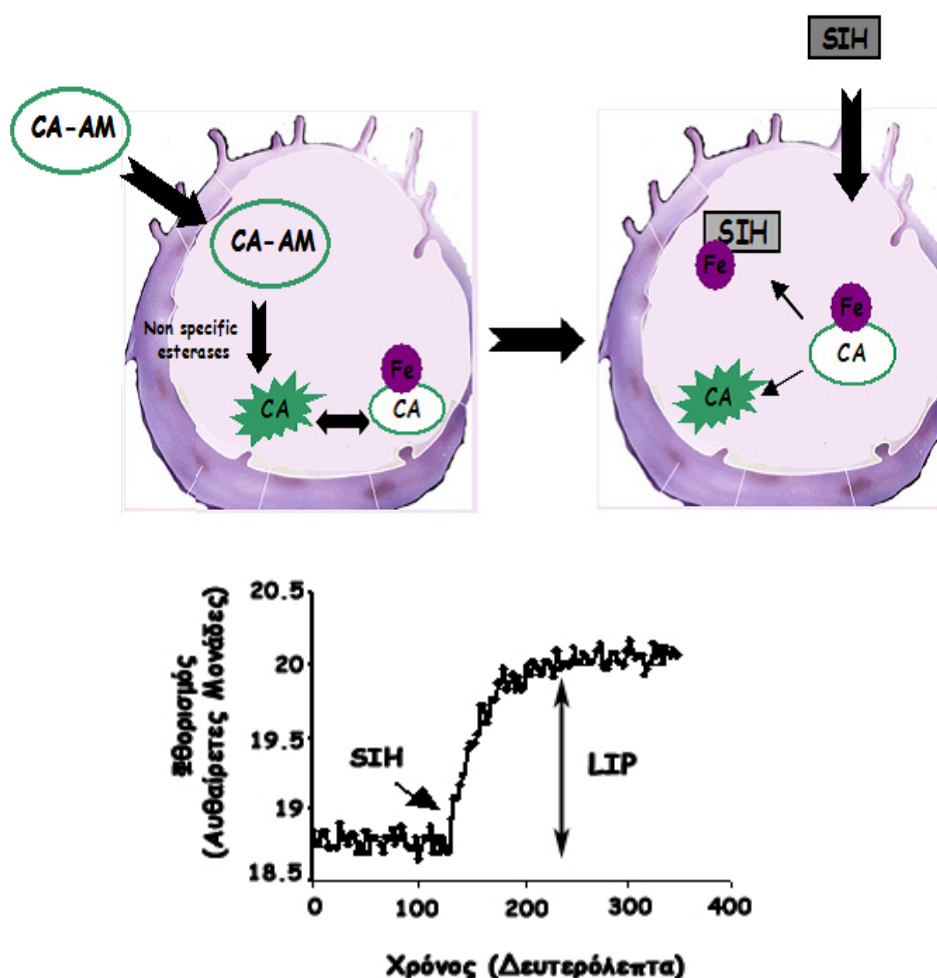


Εικόνα 20. Δομή της καλσεΐνης.

Η καλσεΐνη, λόγω των αρνητικών φορτίων που φέρουν οι καρβοξυλομάδες της σε φυσιολογικό pH, δεν έχει τη δυνατότητα εισόδου μέσα στα κύτταρα. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση της εστεροποιημένης της μορφής (καλσεΐνη-AM, ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης). Η παρουσία των ακετομεθόξυ-εστερικών ομάδων στο μόριο της καλσεΐνης-AM επιτρέπει τη διάχυσή της μέσω της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Μέσα στα κύτταρα οι εστερικές ομάδες υδρολύονται από μη-εξειδικευμένες εστεράσες, με αποτέλεσμα η καλσεΐνη να αποκτά αρνητικό φορτίο και να εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων. Επιπλέον, με την απομάκρυνση των εστερικών ομάδων επαναδιατάσσονται οι διπλοί δεσμοί που υπάρχουν στο μόριό της, γεγονός που την καθιστά ικανή να φθορίζει. Ένα μέρος της καλσεΐνης δεσμεύει ενδοκυττάρια ιόντα μετάλλων (π.χ. ασβεστίου, σιδήρου), κυρίως δισθενή, γεγονός που έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα ιόντα του σιδήρου, έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει



τόσο δισθενή όσο και τρισθενή ιόντα, με σταθερές συγγένειας  $10^{14}$  και  $10^{24} \text{ M}^{-1}$ , αντίστοιχα, που βρίσκονται χαλαρά συνδεδεμένα σε διάφορα μόρια στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε ένα δεύτερο στάδιο, η προσθήκη, σε περίσσεια, ισχυρότερων εξειδικευμένων δεσμευτών σιδήρου με ικανότητα διάχυσης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, όπως του παράγοντα SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) [Kakhlon et al., 2002], που παρουσιάζει σταθερά συγγένειας για το  $\text{Fe}^{3+}$   $10^{31} \text{ M}^{-1}$ , οδηγεί στην απομάκρυνση του σιδήρου από την καλσεΐνη και κατά συνέπεια στην αύξηση του φθορισμού της σε ποσοστό ανάλογο με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στο εσωτερικό ανέπαφων κυττάρων φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της καλσεΐνης.

Εκτός από τις μελέτες για την εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, παρόμοια μεθοδολογία έχει χρησιμοποιηθεί και για το ενδεχόμενο της ύπαρξης οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου έξω από τα

κύτταρα, όπως για παράδειγμα στον ορό του αίματος («Non-transferrin-bound iron, NTBI»). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα των οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου στον ορό, αν υπάρχουν, είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Η ανίχνευσή τους επιτυγχάνεται μόνο σε περιπτώσεις ακραίας υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο, όπου η τρανσφερρίνη είναι περισσότερο από 80% κορεσμένη με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται «ελεύθερα» και οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου στον ορό [Jacobs EM. et al., 2005].

## 1.9. Σκοπός

Τον πυρήνα της παρούσας μελέτης αποτελεί η οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του σιδήρου (LIP) και ο ρόλος που αυτή διαδραματίζει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Αρχικός στόχος ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας κινητοποίησης του ενδοκυττάριου σιδήρου από εξειδικευμένες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, δεδομένης της συσσώρευσης του σιδήρου που παρατηρείται σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος ασθενών με AXN. Παράλληλα, η μελέτη επεκτάθηκε στην ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κύτταρα του περιφερικού αίματος ανθρώπου (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα) καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της νέας αυτής μεθοδολογίας σε παθολογικές καταστάσεις με απώτερο στόχο τη διερεύνηση του ρόλου του LIP στην εξέλιξή τους.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονται από τις παρακάτω εταιρείες:

- *BioRad Laboratories Company, Buckinghamshire, England*

Ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED), υπερθειικό αμμώνιο  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

- *Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA*

Ορός από έμβryo βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως

- *Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany*

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides)

- *Molecular Probes, Eugene, OR, USA*

Ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM)

- *Novartis Company, Basle, Switzerland*

Desferrioxamine mesylate (DFO), Deferiprone (L1)

- *Partec, Germany*

Ισότονο διάλυμα (sheath fluid) κυτταρομετρίας ροής, αντίσωμα CD45-PECy5, αντίσωμα PE anti-human CD71

- *Serva GmbH, Heidelberg, Germany*

Αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως

- *Sigma Company, St. Louis, MO, USA*

Καλλιεργητικά υλικά (DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, RPMI), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), ουρία, καθαρή απο-τρανσφερρίνη, κιτρικό αμμώνιο του σιδήρου, κυανό του τρυπανίου (trypan blue), Triton X-100

Οι ενώσεις SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) και δεφερασιρόξη (ICL-670) ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή Prem Ponka (McGill University, Montreal, Canada) και του Επίκουρου Καθηγητή Δημοσθένη Φωκά (Τμήμα Μηχανικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων) αντίστοιχα. Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

## 2.2. Καλλιέργειες κυττάρων

### 2.2.1. Διατήρηση κυτταρικών σειρών

#### *Κυτταρική σειρά HepG2*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 (*Human hepatocellular liver carcinoma cell line*), η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα ασθενούς με καρκίνο του ήπατος. Η μακροχρόνια διατήρηση της κυτταρικής σειράς έγινε σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: τα κύτταρα, στην εκθετική φάση ανάπτυξης, συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα  $250 \times g$  (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Ακολούθησε επαναιώρηση σε διάλυμα PBS και δεύτερη φυγοκέντρηση. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο μίγμα κατάψυξης (90% FBS, 10% DMSO) και ένα ml του μίγματος αυτού μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes) που ψύχονται σταδιακά στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνται στο υγρό άζωτο όπου και διατηρούνται.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ . Το περιεχόμενο των ειδικών σωληναρίων κατάψυξης μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα  $250 \times g$ . Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό και εν συνεχεία τοποθετήθηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας όπου και καλλιεργήθηκε στις συνήθεις συνθήκες για 24 ώρες.

#### *Κυτταρική σειρά Jurkat*

Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Jurkat, η οποία προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Η μακροχρόνια διατήρηση της κυτταρικής σειράς έγινε σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: τα κύτταρα, στην εκθετική φάση ανάπτυξης,

συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 700 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 5 λεπτά. Ακολούθησε επαναιώρηση σε διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο μίγμα κατάψυξης (90% FBS, 10% DMSO) και ένα ml του μίγματος αυτού μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes) που ψύχονται σταδιακά στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνται στο υγρό άζωτο όπου και διατηρούνται.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ . Το περιεχόμενο των ειδικών σωληναρίων κατάψυξης μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 700 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό και εν συνεχεία τοποθετήθηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας όπου και καλλιεργήθηκε στις συνήθεις συνθήκες για 24 ώρες.

### 2.2.2. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Τα κύτταρα HepG2 προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα και αναπτύσσονται μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπίτου σχηματίζοντας αποφυάδες, σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) που είναι εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό FBS (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  στρεπτομυκίνη για την εξασφάλιση της στειρότητας. Αντίθετα, τα κύτταρα Jurkat αναπτύσσονται ως εναιώρημα σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό FBS (Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  στρεπτομυκίνη για την εξασφάλιση της στειρότητας. Ο χειρισμός των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα για την αποφυγή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific) ο οποίος παρείχε σταθερή θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ , κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5%  $\text{CO}_2$  για τη διατήρηση του pH στο καλλιεργητικό υλικό. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Τα υλικά που

χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από μία φορές αποστειρώθηκαν για μία ώρα στους 120°C.

### 2.2.3. Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τρυπανίου (trypan blue dye exclusion). Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0.25% χρωστικής σε 0.15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονταν πιο φωτεινά και διάφανα ενώ τα νεκρά εμφανίζονταν βαθύ μπλε. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν.

### 2.3. Δείγματα ατόμων

#### *Πρωτόκολλο για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε υγιείς δότες*

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο συμπεριλήφθησαν 41 υγιείς δότες που προσήλθαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων για τη συνήθη διαδικασία της αιμοληψίας μετά από ολονύκτια νηστεία. Τα άτομα, αφού έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για να συμπεριληφθούν στη μελέτη, ενσωματώθηκαν σε αυτή με έναν κωδικό αναγνώρισης.

Η επιλογή των υγιών δοτών έγινε σύμφωνα με τα εξής κριτήρια αποκλεισμού: άτομα με ενεργό ή πρόσφατη λοίμωξη (τον τελευταίο μήνα), κακοήγη νεοπλασματική νόσο, πρόσφατη αιμορραγία, αναιμία, αυτοάνοσες ή χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, νεφρική, ηπατική ή καρδιακή ανεπάρκεια. Ακόμη, αποκλείστηκαν ασθενείς που λάμβαναν φάρμακα με αντιφλεγμονώδη ή αντιοξειδωτική δράση, εκτός από στατίνες, καθώς και πολυβιταμινούχα συμπληρώματα διατροφής.

Μετά την επιλογή των ατόμων ακολουθούσε η πλήρης καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών χαρακτηριστικών του κάθε



συμμετέχοντα. Η γενική εξέταση αίματος και ο βιοχημικός έλεγχος πραγματοποιήθηκαν στα αντίστοιχα εργαστήρια του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η εκτίμηση των επιπέδων του LIP πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (κυτταρομετρητής ροής Becton Dickinson).

*Πρωτόκολλο για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε ασθενείς με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια*

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο συμπεριλήφθησαν 60 ασθενείς με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια, οφειλόμενη σε ισχαιμία ή διατακτική καρδιομυοπάθεια, που ήταν υπό θεραπεία και παρακολούθηση στην Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 2009-2010. Οι ασθενείς, αφού έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για να συμπεριληφθούν στη μελέτη, ενσωματώθηκαν σε αυτή με έναν κωδικό αναγνώρισης.

Η επιλογή των ασθενών πραγματοποιήθηκε με βάση συγκεκριμένα κριτήρια συμμετοχής και αποκλεισμού σύμφωνα με τα οποία: ασθενείς με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια, ισχαιμικής αιτιολογίας ή από διατακτική καρδιομυοπάθεια, διάρκειας μεγαλύτερης από έξι μήνες και με κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF) μικρότερο ή ίσο του 45% ( $LVEF \leq 45\%$ ) συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Επίσης, οι ασθενείς βρίσκονταν στη βέλτιστη θεραπευτική αγωγή για την καρδιακή ανεπάρκεια χωρίς να έχουν αμφικοιλιακούς βηματοδότες ή μηχανική αντλία υποστήριξης της καρδιακής λειτουργίας. Αντίθετα, ασθενείς με οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, σοβαρή βαλβιδοπάθεια, πρόσφατη αγγειοπλαστική, πρόσφατο οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, ενεργό ή πρόσφατη λοίμωξη (τον τελευταίο μήνα), κακοήγη νεοπλασματική νόσο, αιματολογικές δυσκρασίες, αιμορραγικές διαταραχές, πρόσφατη αιμορραγία, αυτοάνοσες ή χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, ή ηπατική ανεπάρκεια αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ακόμη, ασθενείς που λάμβαναν φάρμακα με αντιφλεγμονώδη ή αντιοξειδωτική δράση, εκτός από στατίνες και αναστολείς του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, καθώς και πολυβιταμινούχα συμπληρώματα

διατροφής αποκλείστηκαν. Τέλος, ασθενείς που κατανάλωναν αλκοόλ ή ήταν καπνιστές δε συμμετείχαν στη μελέτη.

Μετά την επιλογή και την εξασφάλιση της συγκατάθεσης των ασθενών ακολουθούσε η πλήρης καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών χαρακτηριστικών του κάθε συμμετέχοντα. Η διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας τέθηκε μετά από ειδικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν στην Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Πιο συγκεκριμένα, ο υπολογισμός του κλάσματος εξώθησης αριστερής κοιλίας (LVEF) έγινε υπερηχογραφικά με απευθείας μέτρηση του τελοσυστολικού και τελοδιαστολικού όγκου αίματος μέσω του κανόνα του Simpson's (μέθοδος δίσκων-επιφανείας). Με υπερηχοκαρδιογραφικές μεθόδους υπολογίστηκε επίσης και η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας (Right Ventricular Systolic Pressure, RVSP). Η γενική εξέταση αίματος και ο βιοχημικός έλεγχος πραγματοποιήθηκαν στα αντίστοιχα εργαστήρια του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ο προσδιορισμός της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) έγινε με ανοσονεφελομετρική μέθοδο υψηλής ευαισθησίας (Beckman Coulter/Immagine Immunochemistry Systems, Behring Diagnostics, Somerville, New Jersey). Ο ρυθμός κάθαρσης της κρεατινίνης εκτιμήθηκε σύμφωνα με τον τύπο Cockcroft-Gault [Scrutinio et al., 2009]. Η εκτίμηση των επιπέδων του LIP πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (κυτταρομετρητής ροής CyFlowML Partec).

Ο πληθυσμός των ασθενών αποτελούνταν από 54 άντρες (42 εκ των οποίων είχαν καρδιακή ανεπάρκεια ισχαιμικής αιτιολογίας) και 6 γυναίκες και ταξινομήθηκε σε δύο ομάδες ανάλογα με το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας. Την πρώτη ομάδα αποτελούσαν ασθενείς με σοβαρή ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας, δηλαδή με  $LVEF \leq 30\%$  και τη δεύτερη ομάδα ασθενείς με μέτρια ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας, δηλαδή με  $LVEF > 30\%$ . Σε μια επιπρόσθετη υποανάλυση, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν με βάση τη λειτουργική τους κατάσταση σύμφωνα με την ταξινόμηση της Καρδιολογικής Εταιρίας της Νέας Υόρκης (New York Heart Association, NYHA) σε δύο επιπλέον ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμπεριλήφθησαν ασθενείς με στάδιο NYHA I και II, ενώ στη δεύτερη ασθενείς με στάδιο NYHA III και IV.

## 2.4. Μέθοδοι

### 2.4.1. Μέτρηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP)

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του LIP στην κυτταρική σειρά HepG2 πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνη. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: κύτταρα HepG2 (150.000/ml) συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 250 x g. Το ίζημα που συλλέχθηκε με τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε σε ένα ml ρυθμιστικού διαλύματος, που περιείχε PBS, 1 mg/ml ορού βοός αλβουμίνης και 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος HEPES με pH=7.3. Ακολούθως, τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.15  $\mu$ M καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά στους 37°C και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 250 x g. Στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε δύο ml του προηγούμενου ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενη κυβέτα (37°C), υπό ανάδευση, όπου ο φθορισμός της καλσεΐνης (μήκος κύματος διέγερσης: 488nm και μήκος κύματος εκπομπής: 517nm) καταγράφηκε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi). Τέλος, προστέθηκε για πέντε λεπτά ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH (11  $\mu$ M) που έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και να αποσπά το σίδηρο που είναι δεσμευμένος με την καλσεΐνη προκαλώντας την αύξηση του φθορισμού της. Η διαφορά του φθορισμού της καλσεΐνης πριν και μετά την προσθήκη του SIH εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες αντιπροσωπεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο που δεσμεύει η καλσεΐνη.

Οι ενώσεις δεσφεριοξαμίνη, δεφεριπρόνη, δεφερασιρόξη και καφεϊκό οξύ προστέθηκαν άμεσα στην κυβέτα αντί του SIH. Η αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης που καταγράφηκε σε κάποιες από τις συγκεκριμένες ενώσεις καταδεικνύει τη δυνατότητα αυτών να αποσπών σίδηρο από την καλσεΐνη. Η μετέπειτα προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH στο τελικό στάδιο του πειράματος πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα των ενώσεων αυτών να αποσπών ολόκληρη την ποσότητα σιδήρου που είναι συνδεδεμένη με την καλσεΐνη.

#### 2.4.2. Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της «ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης», η οποία είναι γνωστή και ως «comet assay». Η comet assay είναι μία απλή, εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μία αλυσίδα του κυτταρικού DNA, που διαθέτει το πλεονέκτημα της μελέτης της βλάβης του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η πρώτη περιγραφή της τεχνικής πραγματοποιήθηκε από τους Ostling και Johanson, οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία [Ostling and Johanson, 1984]. Λίγα χρόνια αργότερα ο Singh και οι συνεργάτες του [Singh et al., 1988] τροποποίησαν την αρχική μορφή της μεθόδου των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξή της. Από τη στιγμή που εμφανίστηκε η μέθοδος, μέχρι σήμερα, έχει υποστεί διάφορες αλλαγές με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητα της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η comet assay έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή τις διπλές αλυσίδες του DNA, αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Για το σκοπό αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH>13) με αποτέλεσμα τη μετουσίωσή του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει τη μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA, που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση, επανασηματίζονται. Έτσι οι σχηματισμοί, που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA, είναι στην πράξη «θηλιές» του DNA, που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικομένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

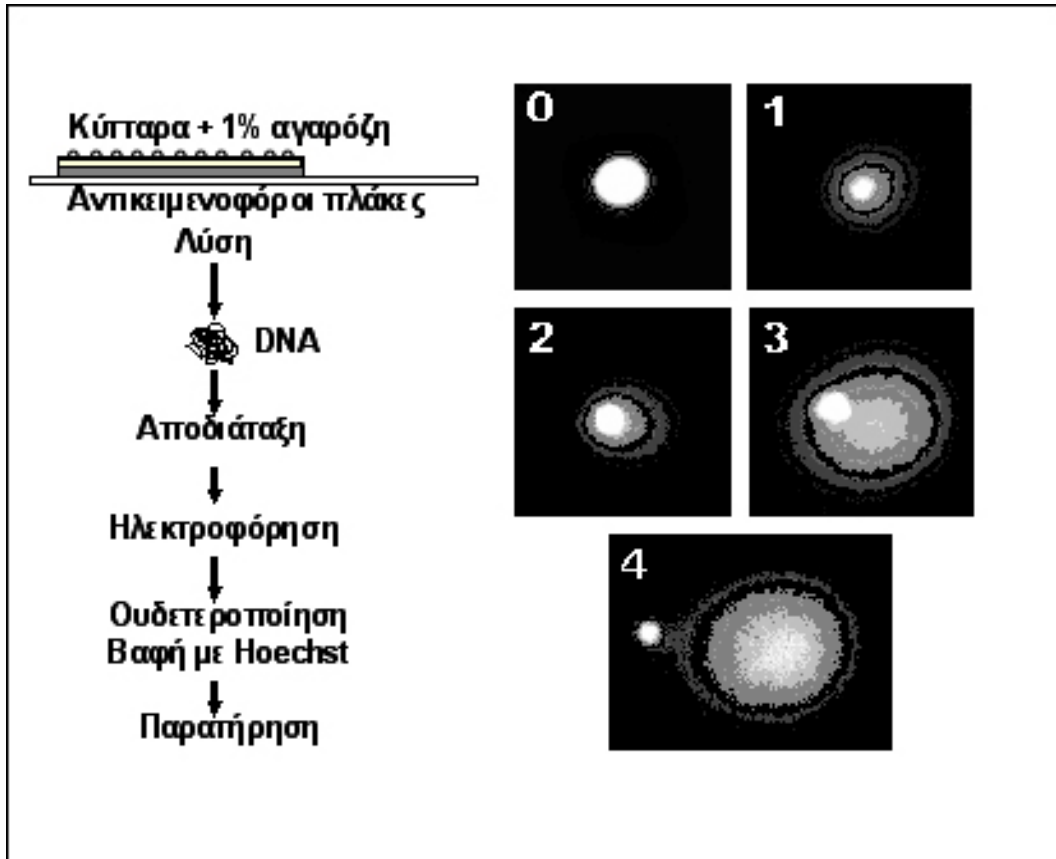
### *Πειραματική διαδικασία*

Μετά την προεπώαση των κυττάρων με τις ενώσεις δεσφεριοξαμίνη, δεφεριπρόνη, δεφερασιρόξη και καφεϊκό οξύ ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε  $H_2O_2$ . Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 450 x g (centrifuge 5415D, Eppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100  $\mu$ l διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1% σε PBS), και σκεπάστηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4  $^{\circ}$ C για δέκα λεπτά, ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10  $\mu$ M Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 10) στους 4  $^{\circ}$ C. Στο στάδιο αυτό οι μεμβράνες και τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά διαλύονται, ενώ το DNA παραμένει εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης, υπερελικομένο και συσκευασμένο σε μία πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μία οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40 λεπτά, έτσι ώστε να ξεδιπλωθούν οι αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Στην συνέχεια η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30 V, 300 mA) για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS (3 φορές από 5 λεπτά η κάθε μία) [Panayiotidis et al., 1999].

### *Αξιολόγηση των σχάσεων*

Για την αξιολόγηση των σχάσεων πραγματοποιήθηκε χρώση του κυτταρικού DNA με προσθήκη 40  $\mu$ l διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (2,5  $\mu$ g/ml σε PBS) ανά πλάκα και παραμονή στο σκοτάδι για 10 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα. Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400. Η βλάβη δεν ήταν ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα βασίστηκε στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Κάθε σχηματισμός κατατάχτηκε σε μία από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (εικόνα 22). Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε ολικά σε αυθαίρετες μονάδες, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά

τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκει. Έτσι, η βλάβη του DNA λαμβάνει τιμές από 0 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 0) έως 400 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 4) αυθαίρετες μονάδες [Panayiotidis et al., 1999].



Εικόνα 22. Καταγραφή των διαφόρων σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής του «comet assay» (A) και μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις (B).

#### 2.4.3. Ανάλυση των διαφόρων μορφών της τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-UPAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης της τρανσφερρίνης επί πήγματος ουρίας-πολυακρυλαμιδίου αποτελεί μια μέθοδο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με αποδιατακτικό παράγοντα την ουρία. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί προϊόν συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του N,N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου

αποτέλεσμα του οποίου είναι ο σχηματισμός τρισδιάστατων πλεγμάτων ηλεκτρικά ουδέτερων. Το μέγεθος των πόρων των πλεγμάτων εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο συνπολυμερισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, APS), μέσω του οποίου απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες, και του καταλύτη N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι η ουρία και για το λόγο αυτό η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-UPAGE).

Σύμφωνα με τους Mackey και Seal [Mackey DG. and Seal US., 1976], η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν, υπό τις συγκεκριμένες αποδιατακτικές συνθήκες, οι μορφές της τρανσφερρίνης μετά τη δέσμευση σιδήρου. Η αποτρανσφερρίνη, που δεν έχει δεσμεύσει σίδηρο, αποδιατάσσεται σχετικά εύκολα και μετακινείται ελάχιστα στην πηκτή, ενώ η μονοσιδηρική τρανσφερρίνη, που έχει δεσμεύσει ένα μόνο ιόν τρισθενούς σιδήρου είτε στο C-λοβό είτε στο N-λοβό, είναι πιο σταθερή και μετακινείται περισσότερο. Τέλος, η δισιδηρική τρανσφερρίνη, που έχει δεσμεύσει δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου, είναι ακόμη πιο σταθερή και διανύει μεγαλύτερο διάστημα στην πηκτή πριν αποδιαταχθεί από την ουρία.

#### *Πειραματική διαδικασία*

Το σύστημα της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel). Η πηκτή επιστοίβαξης, που επιτρέπει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος σε αυτή προτού εισέλθει στην πηκτή διαχωρισμού, περιέχει 4% ακρυλαμίδιο (w/v), διάλυμα TBE (9 mM Tris – 9 mM Borate - 0.2 mM EDTA) με pH=8.2, 10% (w/v) APS, 5 μl TEMED και 6 M ουρία. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια εισέρχεται στην πηκτή διαχωρισμού, η οποία περιέχει 6% ακρυλαμίδιο (w/v), διάλυμα TBE (9 mM Tris – 9 mM Borate - 0.2 mM EDTA) με pH=8.2, 10% (w/v) APS, 2 μl TEMED και 6 M ουρία.

Η προετοιμασία των δειγμάτων ορού περιφερικού αίματος (25 μl) απαιτούσε την επεξεργασία αυτών με την ουσία rivanol lactate (2,5-diamino-7 ethoxyacridine) πριν τη μεταφορά τους στο σύστημα της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου. Η

προσθήκη της ουσίας (200 µl) και η ακόλουθη φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 10000 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου οδήγησε στην κατακρήμνιση της αλβουμίνης και του μεγαλύτερου μέρους των β-σφαιρινών. Παράλληλα, διατήρησε στο υπερκείμενο ανέπαφες τις γ-σφαιρίνες και κάποιες από τις β-σφαιρίνες συμπεριλαμβανομένης της τρανσφερρίνης. Το υπερκείμενο αυτό συλλέχθηκε για την περαιτέρω χρησιμοποίηση του κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Τα δείγματα (2.5 µg καθαρής απο-τρανσφερρίνης και 20 µl από το υπερκείμενο του επεξεργασμένου ορού ανά δείγμα) μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής αφού προηγουμένως αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 (%v/v) με το διάλυμα δείγματος (sample buffer) που περιέχει 9 mM Tris - 9 mM Borate - 0.2 mM EDTA, 0.3 M ficoll, 0.5% διάλυμα χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης και κυανόλης του ξυλενίου καθώς και 6 M ουρία. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE (9 mM Tris - 9 mM Borate - 0.2 mM EDTA) με pH=8.2 στα 125 Volts για περίπου δύομισι ώρες για την περίπτωση των πειραμάτων με την καθαρή αποτρανσφερρίνη και στα 125 Volts για περίπου τρισήμισι ώρες για την περίπτωση των πειραμάτων με την τρανσφερρίνη ορού (συσκευή MINI-PROTEAN II, BIO-RAD).

#### *Οπτικοποίηση και επεξεργασία των ηλεκτροφορητικών δεδομένων*

##### *Coomassie brilliant blue R-250 staining*

Η οπτικοποίηση των ηλεκτροφορητικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω επώασης της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα της χρωστικής ένωσης Coomassie brilliant blue R-250 (0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 9.2% (v/v) οξικό οξύ, 45.5% μεθανόλη) για 30 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα μόρια της χρωστικής συμπλέκονται με τα αμινοξέα τρυπτοφάνη (Trp), τυροσίνη (Tyr), φαινυλανίνη (Phe), ιστιδίνη (His) και λυσίνη (Lys) των πρωτεϊνών μέσω ιοντικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της αντίδρασης χρώσης, ακολούθησε επώαση της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining) (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ) για 30 λεπτά, κατά την οποία τα μόρια χρωστικής απομακρύνονται από μη πρωτεϊνικές περιοχές της πηκτής ενώ οι περιοχές πρωτεΐνης εμφανίζονται ως ζώνες βαθυκύανου χρώματος. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η



αποτύπωση στην πηκτή όλων των μορφών της τρανσφερρίνης, όπως αυτές διαχωρίζονται μετά τη δέσμευση σιδήρου σε αυτή.

#### *Quantity One*

Η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος Quantity One (BIO-RAD). Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (%) έχει υπολογιστεί με την εξής φόρμουλα:  $([\text{Differic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$ .

#### **2.4.4. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής**

Ο ολικός πληθυσμός των λευκοκυττάρων απομονώθηκε μετά από υποοσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων. Ποσότητα (2 ml) ηπαρινισμένου περιφερικού αίματος αναμείχθηκε με διάλυμα λύσης (156 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  και 97  $\mu\text{M}$  EDTA) σε αναλογία 1:6 αντίστοιχα και το μίγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 20 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των ερυθροκυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 5 λεπτά και συλλογή του ίζήματος στο οποίο περιέχονταν τα λευκοκύτταρα. Ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό DMEM και φυγοκεντρήθηκε για ακόμη μια φορά στα 1000 x g για 5 λεπτά. Τελικά, το ίζημα που συλλέχθηκε μετά την τελευταία φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό DMEM σε τελική συγκέντρωση  $1.5 \times 10^6$  λευκοκύτταρα/ml και μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής για την περαιτέρω ανάλυσή του.

#### **2.4.5. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση ερυθροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής**

Ένα ml ηπαρινισμένου περιφερικού αίματος φυγοκεντρήθηκε στα 600 x g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο που περιείχε το μεγαλύτερο ποσοστό των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων του αίματος αφαιρέθηκε, ενώ από το εναπομείναν ίζημα, που περιείχε τα ερυθροκύτταρα, συλλέχθηκαν 10  $\mu\text{l}$ . Η ποσότητα αυτή αναμείχθηκε με

διάλυμα PBS σε αναλογία 1:1000 αντίστοιχα. Τελικά, ένα ml του μίγματος αυτού μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής για την περαιτέρω ανάλυσή του.

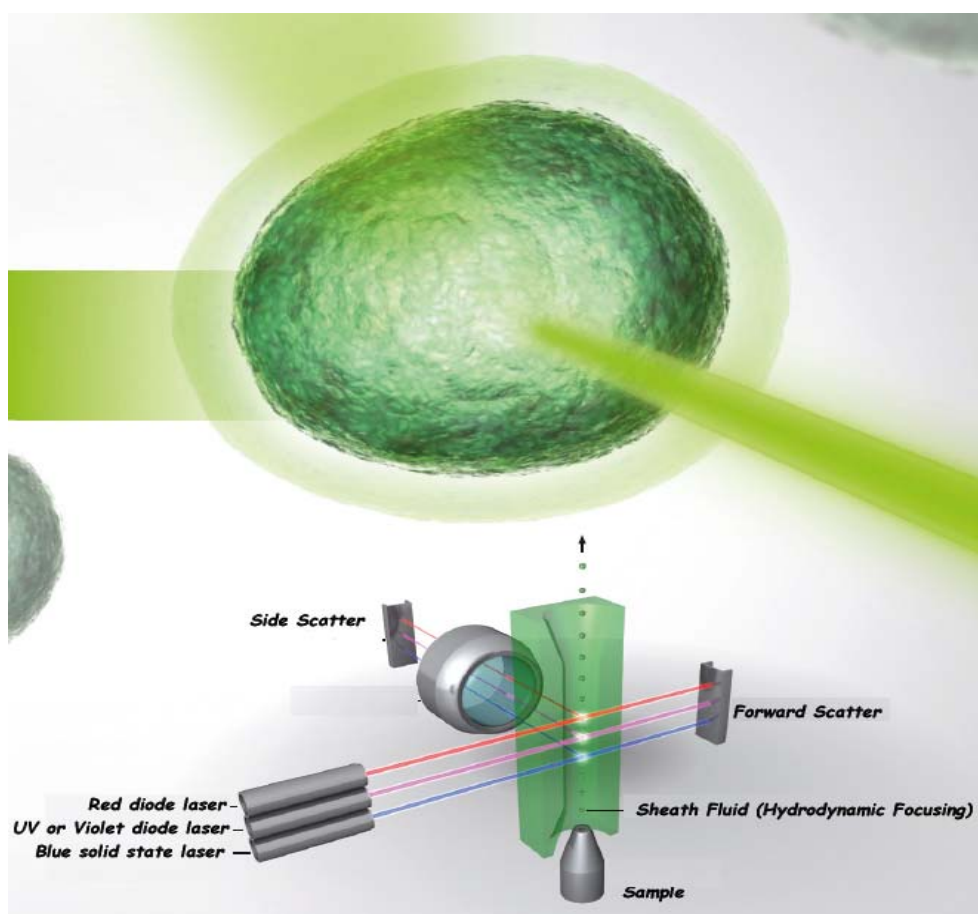
#### **2.4.6. Προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής**

Ποσότητα (100 μl) ηπαρινισμένου περιφερικού αίματος αναμείχθηκε με διάλυμα PBS σε αναλογία 1:10 αντίστοιχα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος στα 600 x g για 5 λεπτά και εν συνεχεία, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα που συλλέχθηκε με τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε σε ένα ml διαλύματος PBS. Από το εναιώρημα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκαν 6ml τα οποία επώαστηκαν με 15 μl αντισώματος CD45-PECy5 (δείκτης που αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων) και 60 μl αντισώματος CD71-PE (δείκτης που χαρακτηρίζει την παρουσία του υποδοχέα τρανσφερίνης-1) για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά, το δείγμα επαναιωρήθηκε σε ένα ml διαλύματος PBS και μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής για την περαιτέρω ανάλυσή του.

#### **2.4.7. Ανάλυση κυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής**

Η ανάλυση των κυττάρων ηπαρινισμένου περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων μοναδιαίων κυττάρων που ρέουν μέσα σε μια συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων [Shapiro H., 2003; Longobardi G.A., 2001]. Παρουσιάζει μοναδικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές τεχνικές, όπως υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα, μεγάλη ποικιλία υλικών που μπορούν να αναλυθούν και δυνατότητα ταυτοποίησης σπάνιων πληθυσμών.

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τα εξής τρία βασικά συστήματα: το υδροδυναμικό σύστημα ροής, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Το υδροδυναμικό σύστημα ροής που διαφορετικά ονομάζεται και σύστημα «fluidics», περιλαμβάνει την κεντρική κυψελίδα ροής που λειτουργεί σαν κανάλι μέσα στο οποίο ρέει το κυτταρικό εναιώρημα, περιβαλλόμενο από ισότονο διάλυμα (sheath fluid) (εικόνα 23). Χαρακτηριστικό του συστήματος είναι η εφαρμογή της υδροδυναμικής εστίασης που επιτυγχάνει τη ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη. Η υδροδυναμική εστίαση εξασφαλίζεται με κατάλληλη ρύθμιση των ταχυτήτων τόσο του δείγματος όσο και του ισότονου διαλύματος.



**Εικόνα 23.** Αναπαράσταση του υδροδυναμικού συστήματος ροής και του οπτικού συστήματος ενός κυτταρομετρητή ροής.

Το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει μονοχρωματικές πηγές φωτός (μια ή και περισσότερες) που είναι γνωστές με τον όρο «laser», καθώς και ένα πολύπλοκο σύστημα φακών, φωτοανιχνευτών και φωτοπολλαπλασιαστών (εικόνα 22). Με την πρόσκρουση της ακτίνας laser επάνω στα κύτταρα, καθώς αυτά εξέρχονται από την

κυψελίδα ροής σε μονήρη διάταξη, προκαλείται πρόσθιος σκεδασμός (Forward Scatter) που αντιστοιχεί στο μέγεθος των κυττάρων και πλάγιος σκεδασμός (Side Scatter) που αφορά την κοκκίωση τους, την πυκνότητα δηλαδή του εσωτερικού τους περιεχομένου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτό να διαχωριστεί ηλεκτρονικά ο πληθυσμός που μας ενδιαφέρει σχηματίζοντας γύρω του μια περίφραξη (gating), χωρίς να απαιτείται η απομόνωση του κάθε είδους κυττάρου χωριστά. Επιπλέον, η ακτίνα laser προκαλεί διέγερση στις φθορίζουσες χρωστικές με τις οποίες μπορεί να έχουν σημειωθεί τα κύτταρα προκαλώντας την εκπομπή σήματος διαφορετικού μήκους κύματος για κάθε μια από αυτές.

Η συλλογή των φωτεινών σημάτων και η διοχέτευσή τους στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή επιτυγχάνεται με το σύστημα των φακών, των φωτοανιχνευτών και των φωτοπολλαπλασιαστών. Το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων μετατρέπει τα φωτεινά σήματα σε δεδομένα τα οποία αναλύονται μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή του κυτταρομετρητή ροής. Η σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ιστογραμμάτων (histogram) και στικτογραμμάτων (dot plot).

#### **2.4.8. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής**

Η εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε πληθυσμούς κυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε μέσω μιας νέας μεθοδολογίας που περιλαμβάνει τη χρήση μιας ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας, της καλσεΐνης, σε συνδυασμό με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής.

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων των διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων περιφερικού αίματος (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα), ακολούθησε η ανάλυση αυτών σε κυτταρομέτρο ροής (Beckton Dickinson, USA και Partec, Germany). Με βάση τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό, που αντιστοιχούν στο μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων αντίστοιχα, ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων διαχωρίστηκε σε τρεις διακριτούς υποπληθυσμούς (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), ενώ παράλληλα εντοπίστηκε ο πληθυσμός των ερυθροκυττάρων. Όσον αφορά τον εντοπισμό του πληθυσμού των δικτυοερυθροκυττάρων, αυτός πραγματοποιήθηκε μέσω των

επιφανειακών δεικτών CD45 και CD71 που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στη συνέχεια, οι πληθυσμοί των κυττάρων επώαστηκαν με 5 nM καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά στους 37°C στο σκοτάδι και ακολούθως ο φθορισμός της καλσεΐνης καταγράφηκε στο πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρομετρητή ροής εκφρασμένος σε αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units). Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας, προστέθηκε για 5 λεπτά ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH (100 μM), ο οποίος προκάλεσε μια περαιτέρω αύξηση του φθορισμού των κυττάρων που καταγράφηκε και πάλι στον κυτταρομετρητή ανάλυσης. Η διαφορά του φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη του SIH αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του LIP που δεσμεύει η καλσεΐνη στους πληθυσμούς των λευκοκυττάρων, των ερυθροκυττάρων και των δικτυοερυθροκυττάρων.

#### 2.4.9. Στατιστική ανάλυση

Η καταγραφή όλων των δεδομένων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός πακέτου φύλλων εργασίας ενώ η στατιστική τους ανάλυση με τη χρήση στατιστικών πακέτων. Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Microsoft Office Excel 2007 και SPSS (version 13.0, Inc. Chicago, Illinois), τόσο για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσο και για τις γραφικές απεικονίσεις των διαγραμμάτων. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (mean  $\pm$  SD), εκτός από τις μη παραμετρικές μεταβλητές οι οποίες παρουσιάστηκαν ως διάμεση τιμή (εύρος). Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής που ακολουθούν οι μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov test. Η σύγκριση μεταξύ μεταβλητών που ακολουθούν κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε μέσω του Student's t-test, ενώ μεταξύ αυτών που έχουν μη-κανονική κατανομή με το Mann-Whitney U test. Η συσχέτιση μεταξύ του κλάσματος εξώθησης αριστερής κοιλίας (LVEF) και διαφόρων άλλων παραμέτρων έγινε με το συντελεστή του Pearson's και του Spearman's (κανονική, μη-κανονική κατανομή, αντίστοιχα). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης συσχέτισης της σοβαρότητας της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας με διάφορες παραμέτρους και συσχέτισης της λειτουργικής κατάστασης κατά NYHA με διάφορες παραμέτρους. Τιμή  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

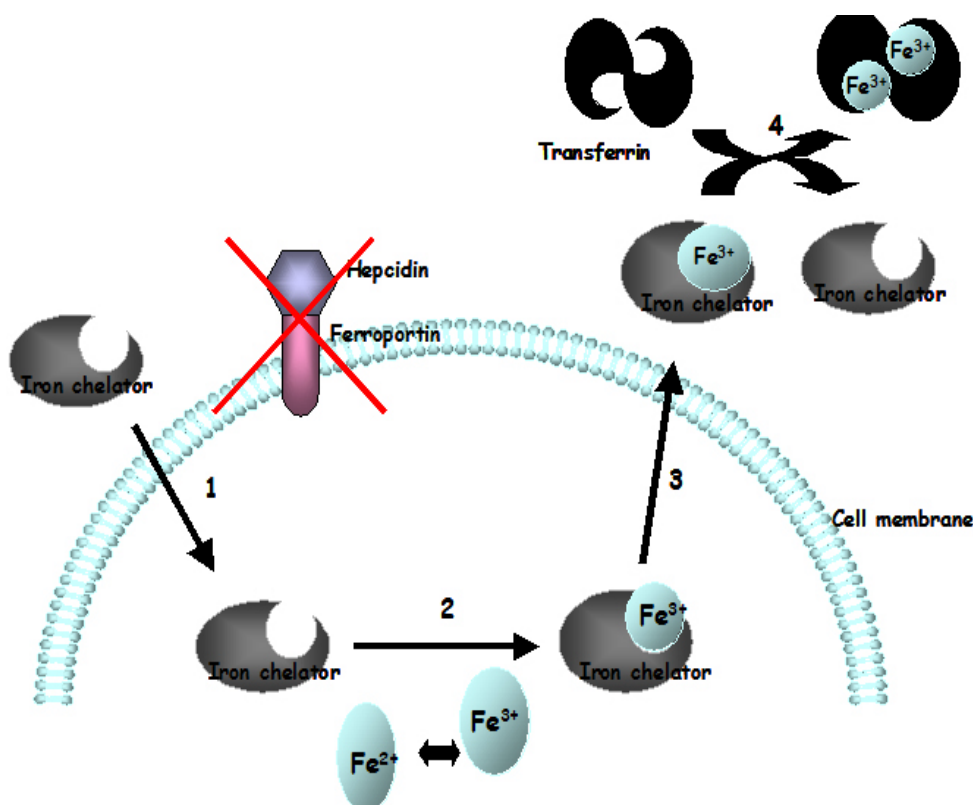
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Μέρος Α

#### 3.1. Χρήση σιδηροδεσμευτικών ενώσεων για την κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου

Οι AXN, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση σιδήρου στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος λόγω της αλληλεπίδρασης ηπατιδίνης-φερροπορτίνης. Η κινητοποίηση του «εγκλωβισμένου» ενδοκυττάριου σιδήρου θα μπορούσε να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική πρόταση για την καλύτερη αντιμετώπιση των AXN.

Για το σκοπό αυτό, σε ένα πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε η ικανότητα εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων να κινητοποιούν τον ενδοκυττάριο σίδηρο σε κύτταρα σε καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η δυνατότητα των ενώσεων αυτών α) να διαχέονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, β) να δεσμεύουν το διαθέσιμο ενδοκυττάριο σίδηρο (labile iron pool), γ) να διαχέονται εκ νέου εκτός του κυττάρου ως σύμπλοκο με το σίδηρο παρακάμπτοντας με τον τρόπο αυτό το εμπόδιο ηπατιδίνης-φερροπορτίνης και τέλος δ) να αποδίδουν το σίδηρο στην τρανσφερρίνη του ορού για την περαιτέρω αναδιανομή του (εικόνα 24). Το σύστημα μελέτης περιελάμβανε τρία φαρμακευτικά σκευάσματα, που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην κλινική πράξη, τη δεσφεριοξαμίνη, τη δεφεριπρόνη και τη δεφερασιρόξη καθώς και μια ένωση φυτικής προέλευσης, το καφεϊκό οξύ.

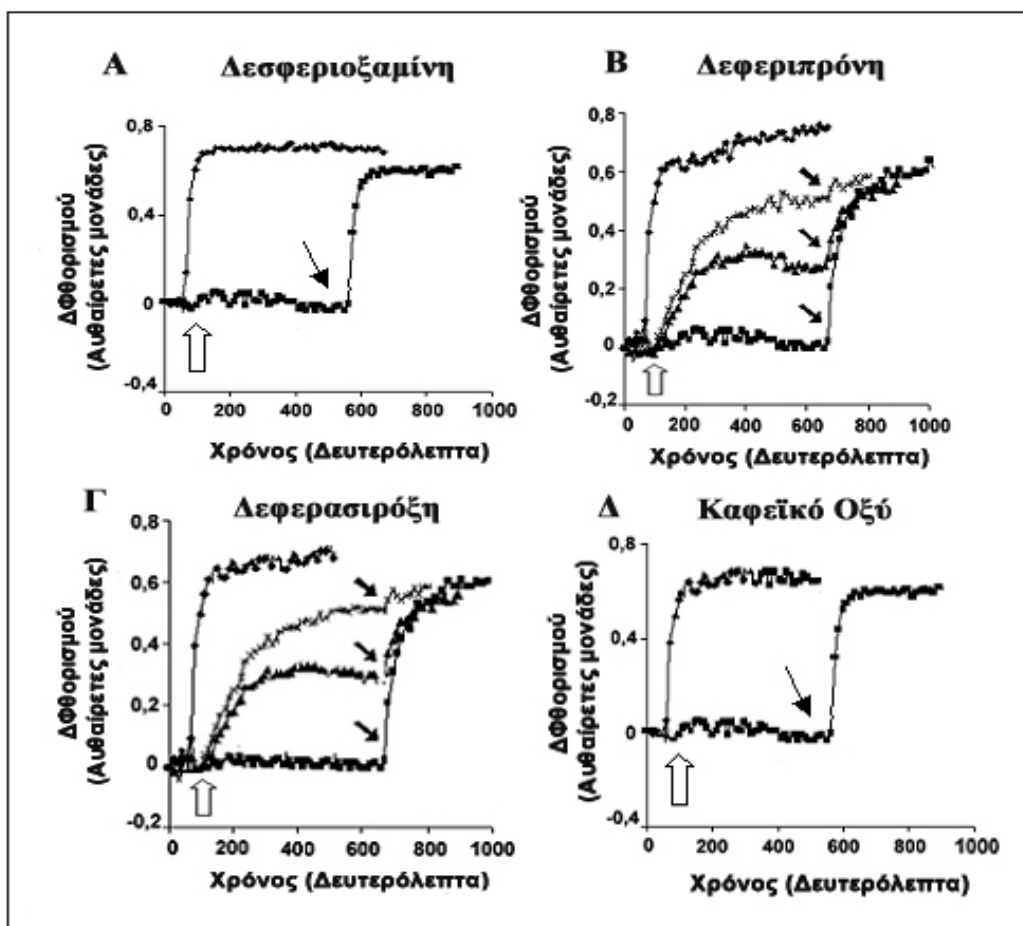


Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών βημάτων μιας υποθετικής σιδηροδεσμευτικής ένωσης με δυνατότητα κινητοποίησης του σιδήρου από το εσωτερικό των κυττάρων προς την τρανσφερρίνη του εξωκυττάριου χώρου. Η σιδηροδεσμευτική ένωση θα πρέπει να διαχέεται δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων (1), να δεσμεύει τα διαθέσιμα ιόντα σιδήρου στα διάφορα διαμερίσματα του εσωτερικού των κυττάρων (2) και στη συνέχεια να διαχέεται εκ νέου προς το εξωτερικό των κυττάρων ως σύμπλοκο ένωσης-σιδήρου (3) όπου και να αποδίδει το σίδηρο στην τρανσφερρίνη (4).

### 3.1.1. Ενδοκυττάρια δέσμευση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP)

Σε μια πρώτη φάση, οι ενώσεις δεσφериοξαμίνη (DFO), δεφεριπρόνη (DFP), δεφερασιρόξη (ICL-670) και καφεϊκό οξύ ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να δεσμεύουν το διαθέσιμο σίδηρο. Ο προσδιορισμός της δέσμευσης του LIP πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της καλσεΐνης, όπως αυτή αναπτύχθηκε από τους Epsztejn et al. το 1997.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25Α, η προσθήκη 150  $\mu\text{M}$  δεσφериοξαμίνης σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με καλσεΐνη-AM δεν προκάλεσε αλλαγή στο φθορισμό της καλσεΐνης, ενώ η επακόλουθη προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH, στο τέλος του πειράματος, οδήγησε σε αύξηση του φθορισμού αντίστοιχη με εκείνη των κυττάρων μαρτύρων.



**Εικόνα 25.** Ενδοκυττάρια δέσμευση του σιδήρου από τις ενώσεις δεσφериοξαμίνη, δεφериπρόνη, δεφериσιρόξη και καφείκό οξύ. Κύτταρα HepG2 (150.000/ml) επώαστηκαν με 0.15  $\mu\text{M}$  καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά. Τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύει η καλσεΐνη σε κύτταρα μάρτυρες ( $\blacklozenge$ ) προσδιορίστηκαν μετά την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH (11  $\mu\text{M}$ ) (κενά βέλη). Στη συνέχεια, η δεσφериοξαμίνη (150  $\mu\text{M}$ ) (Α), η δεφериπρόνη (5, 50 και 150  $\mu\text{M}$ , με σύμβολα  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ , και  $\times$ , αντίστοιχα) (Β), η δεφериσιρόξη (5, 50 και 150  $\mu\text{M}$ , με σύμβολα  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ , και  $\times$ , αντίστοιχα) (Γ) ή το καφείκό οξύ (150  $\mu\text{M}$ ) (Δ) προστέθηκαν απευθείας στην κυψελίδα αντί του SIH και η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο για περίπου 10 λεπτά. Στο τέλος των πειραμάτων, προστέθηκε SIH (βέλη) προκειμένου να καθοριστεί το ποσό του σιδήρου που παρέμεινε δεσμευμένο στην καλσεΐνη.



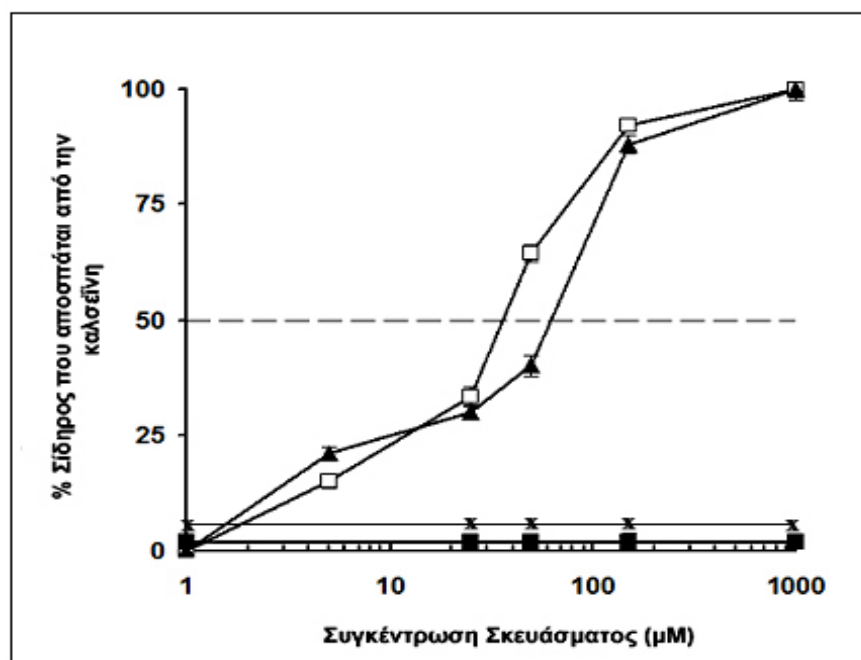
Η απουσία αύξησης του φθορισμού μετά την προσθήκη της δεσφεριοξαμίνης θα πρέπει να οφείλεται στην ιδιαιτερότητα που παρουσιάζει η ένωση αυτή όσον αφορά τον τρόπο εισόδου της στα κύτταρα παρά στην ικανότητά της να αποσπά σίδηρο από την καλσεΐνη. Είναι γνωστό ότι η δεσφεριοξαμίνη δε μπορεί να διαχυθεί μέσω της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, αλλά εισέρχεται μέσω της διαδικασίας της ενδοκύττωσης υγρής φάσης [Doulias et al., 2003]. Η διαδικασία αυτή απαιτεί σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα σε σχέση με το διάστημα που έγινε η μέτρηση του φθορισμού της καλσεΐνης.

Σε αντίθεση με τη δεσφεριοξαμίνη, η προσθήκη δεφεριπρόνης (5, 50 και 150  $\mu\text{M}$ ) σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με καλσεΐνη-AM παρουσίασε μια βαθμιαία αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει τη δυνατότητα της δεφεριπρόνης να διαχέεται στο εσωτερικό των κυττάρων και να αποσπά σίδηρο από την καλσεΐνη (εικόνα 25B). Η επακόλουθη προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH στα δείγματα με τις μικρότερες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης (5 και 50  $\mu\text{M}$ ) είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης, ενώ η προσθήκη του στο δείγμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση δεφεριπρόνης (150  $\mu\text{M}$ ) δεν οδήγησε σε παρόμοιο αποτέλεσμα. Η απουσία αυτή της αύξησης του φθορισμού οφείλεται στην ικανότητα της δεφεριπρόνης στη συγκεκριμένη συγκέντρωση (150  $\mu\text{M}$ ) να απομακρύνει ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που ήταν δεσμευμένη στην καλσεΐνη. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στην περίπτωση της δεφερασιρόξης (εικόνα 25Γ).

Στην περίπτωση της προσθήκης του καφεϊκού οξέος (150  $\mu\text{M}$ ) σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με καλσεΐνη-AM δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στο φθορισμό της καλσεΐνης, ενώ η επακόλουθη προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH, στο τέλος του πειράματος, οδήγησε σε αύξηση του φθορισμού αντίστοιχη με εκείνη των κυττάρων μαρτύρων (εικόνα 25Δ). Η απουσία αύξησης του φθορισμού μετά την προσθήκη του καφεϊκού οξέος φαίνεται να σχετίζεται με τον τρόπο εισόδου του στα κύτταρα, όπως και στην περίπτωση της δεσφεριοξαμίνης, δεδομένου ότι το καφεϊκό οξύ, σύμφωνα με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας, έχει την ικανότητα να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο.

Θεωρώντας ως 100% την ποσότητα του σιδήρου που αποσπάται από την καλσεΐνη μετά την προσθήκη του SIH σε κύτταρα μάρτυρες, υπολογίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό του σιδήρου που αποσπάται από την καλσεΐνη μετά την προσθήκη των προηγούμενων ενώσεων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (εικόνα 26).

Στην περίπτωση της δεσφεριοξαμίνης και του καφεϊκού οξέος, δεν παρατηρήθηκε απόσπαση του σιδήρου από την καλσεΐνη για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (1, 25, 50, 150 και 1000  $\mu\text{M}$ ). Αντιθέτως, στις περιπτώσεις της δεφεριπρόνης και της δεφερασιρόξης (1, 5, 25, 50, 150 και 1000  $\mu\text{M}$ ) καταγράφηκε μια σταδιακή αύξηση των επιπέδων του σιδήρου που αποσπώνται από την καλσεΐνη. Τόσο η δεφεριπρόνη όσο και η δεφερασιρόξη στη συγκέντρωση των 150  $\mu\text{M}$  είχαν τη δυνατότητα να αποσπάσουν ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που ήταν δεσμευμένη στην καλσεΐνη. Ως  $\text{EC}_{50}$  ορίζεται η συγκέντρωση του φαρμακευτικού σκευάσματος η οποία μπορεί να αποσπάσει το 50% του συνολικού σιδήρου που δεσμεύει η καλσεΐνη. Σύμφωνα με την εικόνα 25, η τιμή  $\text{EC}_{50}$  για τη δεφεριπρόνη και τη δεφερασιρόξη ήταν 40  $\mu\text{M}$  και 62  $\mu\text{M}$ , αντίστοιχα.



**Εικόνα 26.** Υπολογισμός τιμών  $\text{EC}_{50}$  της δεσφεριοξαμίνης, της δεφεριπρόνης, της δεφερασιρόξης και του καφεϊκού οξέος. Κύτταρα HepG2 (150.000/ml) επώαστηκαν με 0.15  $\mu\text{M}$  καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά. Η δεσφεριοξαμίνη (-■-), η δεφεριπρόνη (-□-), η δεφερασιρόξη (-▲-) ή το καφεϊκό οξύ (-x-) προστέθηκαν στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις απευθείας στην κυψελίδα και από την αύξηση του φθορισμού μετά την πάροδο δέκα λεπτών από την προσθήκη τους υπολογίστηκε το ποσοστό επί τοις εκατό του σιδήρου που αποσπάστηκε από την καλσεΐνη. Ως εκατό τοις εκατό του σιδήρου που αποσπάται από την καλσεΐνη θεωρήθηκε η αύξηση του φθορισμού που προκαλείται μετά την προσθήκη 11  $\mu\text{M}$  SIH. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή δύο διαφορετικών πειραμάτων.

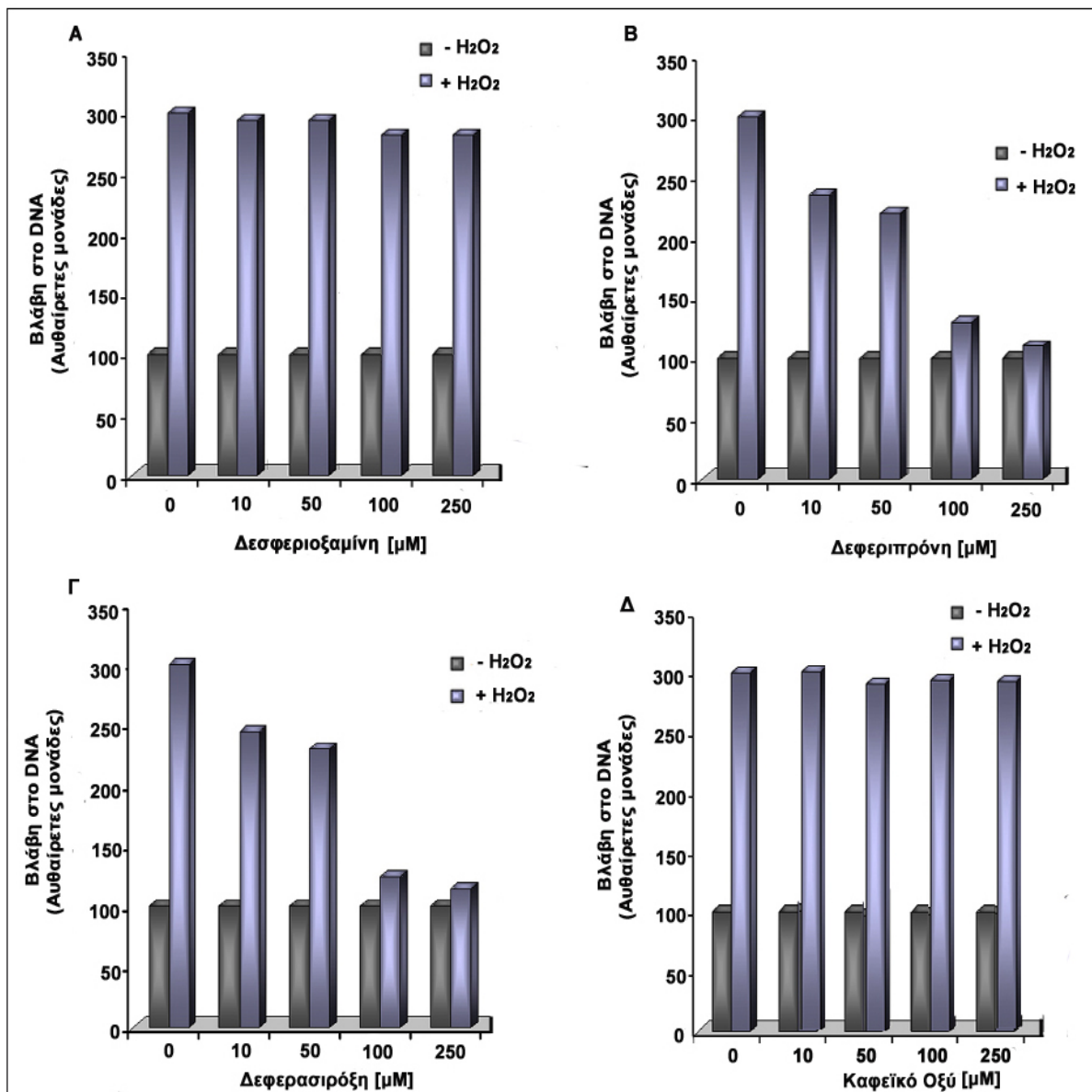
### 3.1.2. Προστασία του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Η δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου έχει προταθεί στο παρελθόν ως μηχανισμός προστασίας ενάντια στη βλάβη του DNA, όταν αυτή προκαλείται από το  $H_2O_2$  [Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003]. Έτσι, σε ένα επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης, ελέγχθηκε η ικανότητα τόσο των φαρμακευτικών σκευασμάτων όσο και του καφεϊκού οξέος να προστατεύουν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε  $H_2O_2$ . Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων Jurkat που προεπώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης, δεφεριπρόνης, δεφερασιρόξης και καφεϊκού οξέος αντίστοιχα και ακολούθως εκτέθηκαν σε 200  $\mu M$   $H_2O_2$ . Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η ευαίσθητη τεχνική της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (comet assay) για την αξιολόγηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA. Η προστατευτική δράση των προηγούμενων ενώσεων αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της επί τοις εκατό μείωσης της βλάβης που προκλήθηκε από το  $H_2O_2$  στα κύτταρα που είχαν προεπωαστεί με τις ενώσεις αυτές. Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη που προκαλείται στο DNA όταν τα κύτταρα εκτεθούν απουσία των ενώσεων αυτών σε 200  $\mu M$   $H_2O_2$ .

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27A, η προεπώαση των κυττάρων για 30 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (10, 50, 100 και 250  $\mu M$ ), πριν την έκθεσή τους σε  $H_2O_2$ , δεν προσέφερε προστασία ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το  $H_2O_2$  στο κυτταρικό DNA. Ωστόσο, σημαντική μείωση της βλάβης που προκαλείται στο DNA παρατηρήθηκε μετά την προεπώαση των κυττάρων με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης για περισσότερο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, η προεπώαση των κυττάρων για 120 λεπτά με 1000  $\mu M$  δεσφεριοξαμίνης οδήγησε σε μια σημαντική μείωση, της τάξης του 90%, της βλάβης που προκαλείται στο DNA (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Το γεγονός αυτό είναι συνυφασμένο με τον τρόπο εισόδου της ουσίας αυτής στα κύτταρα που όπως έχει ήδη αναφερθεί απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα.

Αντίθετα, η προεπώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης και δεφερασιρόξης (10, 50, 100 και 250  $\mu M$ ) αντίστοιχα, προσέφερε προστασία ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το  $H_2O_2$  στο κυτταρικό DNA (εικόνα 27B και 27Γ). Ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις (10 και 50  $\mu M$ ) των συγκεκριμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων μπορούσαν να προκαλέσουν μείωση της βλάβης που παρατηρείται στο κυτταρικό DNA κατά 30%, ενώ η συγκέντρωση των 100  $\mu M$  είχε

τη δυνατότητα να μειώσει τη βλάβη του DNA κατά 85%, υποδηλώνοντας την ικανότητά τους να εισέρχονται στα κύτταρα και να δεσμεύουν τον οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο.



**Εικόνα 27.** Προστατευτική δράση των ενώσεων δεσφериοξαμίνη, δεφεριπρόνη, δεφερασιρόξη και καφεϊκό οξύ ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο κυτταρικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10<sup>6</sup>/ml) προεπεώσθησαν για 30 λεπτά με δεσφериοξαμίνη (Α), δεφεριπρόνη (Β), δεφερασιρόξη (Γ) και καφεϊκό οξύ (Δ) αντίστοιχα στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια εκτέθηκαν (ανοιχτόχρωμες στήλες) ή δεν εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες στήλες) σε 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 10 λεπτά. Ακολούθως, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

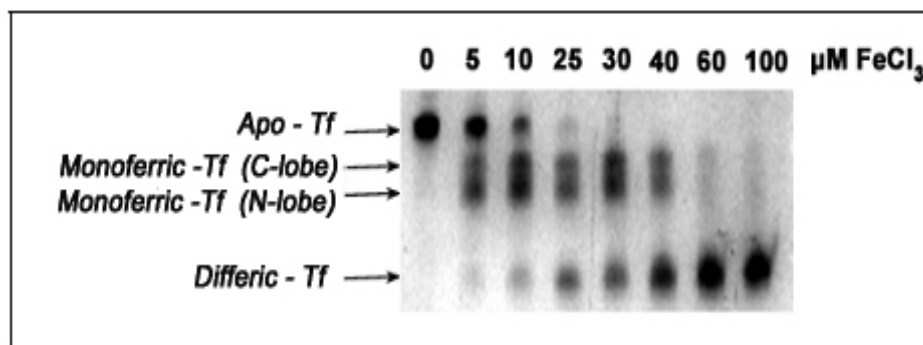
Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, καθίσταται εμφανές ότι τόσο η δεφεριπρόνη όσο και η δεφερασιρόξη έχουν την ικανότητα να προσφέρουν τη μέγιστη προστασία ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το  $H_2O_2$  στο κυτταρικό DNA σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (250  $\mu M$  του αντίστοιχου φαρμακευτικού σκευάσματος) σε σύγκριση με τη δεσφεριοξαμίνη, της οποίας η μέγιστη προστατευτική δράση επιτυγχάνεται στη συγκέντρωση των 1000  $\mu M$ . Το γεγονός αυτό θα πρέπει να σχετίζεται με το διαφορετικό τρόπο εισόδου των φαρμακευτικών σκευασμάτων στο κύτταρο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τόσο η δεφεριπρόνη όσο και η δεφερασιρόξη εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω διάχυσης, ενώ η δεσφεριοξαμίνη εισέρχεται με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης που απαιτεί σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι ενώσεις στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασαν τοξικές επιπτώσεις στα κύτταρα.

Τέλος, η προεπάση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος (10, 50, 100 και 250  $\mu M$ ) δεν προσέφερε προστασία ενάντια στη βλάβη που προκαλείται από το  $H_2O_2$  στο DNA (εικόνα 27Δ). Αντίθετα, προεπάση των κυττάρων με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος προσέφερε αξιόλογη προστασία. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των 1000  $\mu M$  προκάλεσε μείωση της βλάβης του DNA κατά 35%, ενώ η συγκέντρωση των 3000  $\mu M$  κατά 81% (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

### 3.1.3. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης, αξιολογήθηκε η ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στις προηγούμενες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις. Η ικανότητα αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης της τρανσφερρίνης σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμίδιου (Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, U-PAGE), όπως αυτή αναπτύχθηκε από τους Mackey και Seal το 1976. Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν οι μορφές της τρανσφερρίνης μετά τη δέσμευση σιδήρου, υπό τις συγκεκριμένες αποδιατακτικές συνθήκες (6M ουρία) (εικόνα 28). Γενικά, η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων διαλύματος τρισθενούς σιδήρου σε καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu M$ ) έχει ως αποτέλεσμα η τρανσφερρίνη που δε δεσμεύει

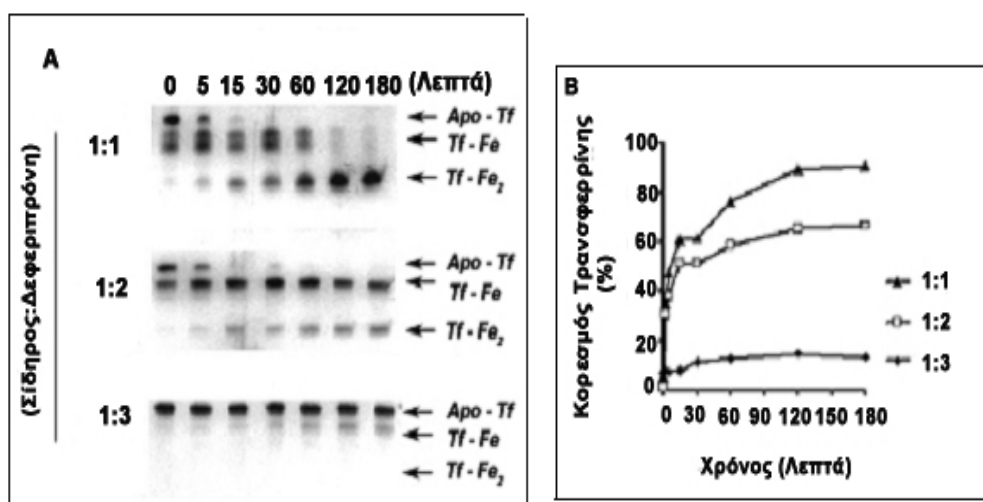
σίδηρο (αποτρανσφερρίνη) να αποδιατάσσεται σχετικά εύκολα και να μετακινείται ελάχιστα στην πηκτή, ενώ η τρανσφερρίνη που δεσμεύει ένα μόνο ιόν τρισθενούς σιδήρου είτε στο C είτε στο N-λοβό (monoferric) να είναι πιο σταθερή και να μετακινείται περισσότερο. Τέλος, η πρωτεΐνη που δεσμεύει δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου (diferric) είναι σταθερότερη και διανύει μεγαλύτερο διάστημα στην πηκτή πριν αποδιαταχθεί από την ουρία.



**Εικόνα 28.** Διαχωρισμός των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE). Η αποτρανσφερρίνη αποδιατάσσεται γρήγορα από την ουρία με αποτέλεσμα να εμφανίζει μικρή κινητικότητα. Αντίθετα, η δέσμευση σιδήρου έχει ως συνέπεια η τρανσφερρίνη να γίνεται πιο συμπαγής και να εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα από την αποτρανσφερρίνη. Η δισιδηρική τρανσφερρίνη εμφανίζει τη μεγαλύτερη κινητικότητα, ενώ η μονοσιδηρική με ένα ιόν σιδήρου είτε στο C-λοβό είτε στο N-λοβό εμφανίζεται ενδιάμεσα.

Για τη μελέτη, λοιπόν, της ικανότητας της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στις σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, δημιουργήθηκαν σύμπλοκα σιδήρου:δεφεριπρόνης, σιδήρου:δεφερασιρόξης, σιδήρου:δεσφериοξαμίνης και σιδήρου:καφεϊκού οξέος που επώαστηκαν με καθαρή αποτρανσφερρίνη (25 μM) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 180 λεπτά). Όσον αφορά την περίπτωση του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:1, διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης. Έτσι, μετά το πέρας των 120 λεπτών επώασης, η τρανσφερρίνη είχε μετατραπεί εξ ολοκλήρου στη δισιδηρική μορφή, καθώς είχε προσλάβει ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που ήταν δεσμευμένη στη δεφεριπρόνη (εικόνα 29A). Η μέγιστη τιμή του κορεσμού της ήταν 93% (εικόνα 29B). Στο σύμπλοκο σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:2,

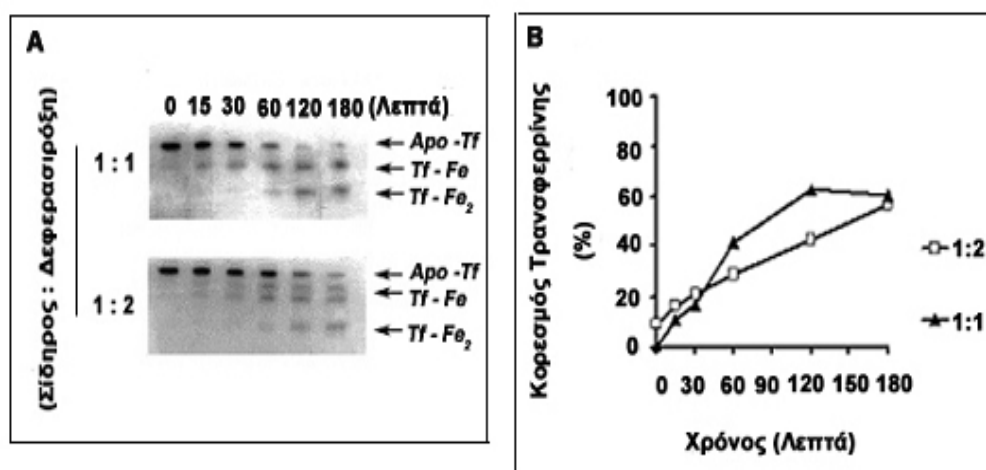
παρατηρήθηκε δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την προηγούμενη αναλογία, καθώς σε κανένα από τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα δεν υπήρξε πλήρης μετατροπή της στη δισιδηρική μορφή (εικόνα 29A). Η μέγιστη τιμή του κορεσμού της ήταν 60% (εικόνα 29B). Αντιθέτως, στην περίπτωση του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:3, δεν παρατηρήθηκε δέσμευση του σιδήρου του συμπλόκου στην τρανσφερρίνη (εικόνα 29A) και γι' αυτό ο κορεσμός της έφτασε μόλις το 10% (εικόνα 29B).



**Εικόνα 29. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφεριπρόνης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu$ M) επώαστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης σε αναλογίες 1:1, 1:2 και 1:3 (σιδήρου:δεφεριπρόνης) για 30 λεπτά. Ακολούθως, καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu$ M) προστέθηκε στο διάλυμα για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 180 λεπτά) και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δέσμευση του σιδήρου σε αυτή με ηλεκτροφόρηση U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Με βάση τα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, φαίνεται ότι η ικανότητα της τρανσφερρίνης να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου εξαρτάται από την αναλογία στην οποία βρίσκονται ο σίδηρος με τη δεφεριπρόνη σε αυτό. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνει η ποσότητα της δεφεριπρόνης σε σχέση με το σίδηρο, τόσο η τρανσφερρίνη αποσπά με δυσκολία το σίδηρο από το σύμπλοκο, πιθανώς λόγω στερικής παρεμπόδισης.

Όσον αφορά το σύμπλοκο σιδήρου:δεφερασιρόξης που ήταν σε αναλογία 1:1, σημειώθηκε μια σταδιακή αύξηση της δέσμευσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης, αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την αντίστοιχη περίπτωση της δεφεριπρόνης (εικόνα 30A). Η μέγιστη τιμή του κορεσμού τρανσφερρίνης, όπως αυτή αποτυπώνεται στο αντίστοιχο διάγραμμα, ήταν 60% (εικόνα 30B). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο σύμπλοκο σιδήρου:δεφερασιρόξης που ήταν σε αναλογία 1:2 (εικόνα 30A και 30B).



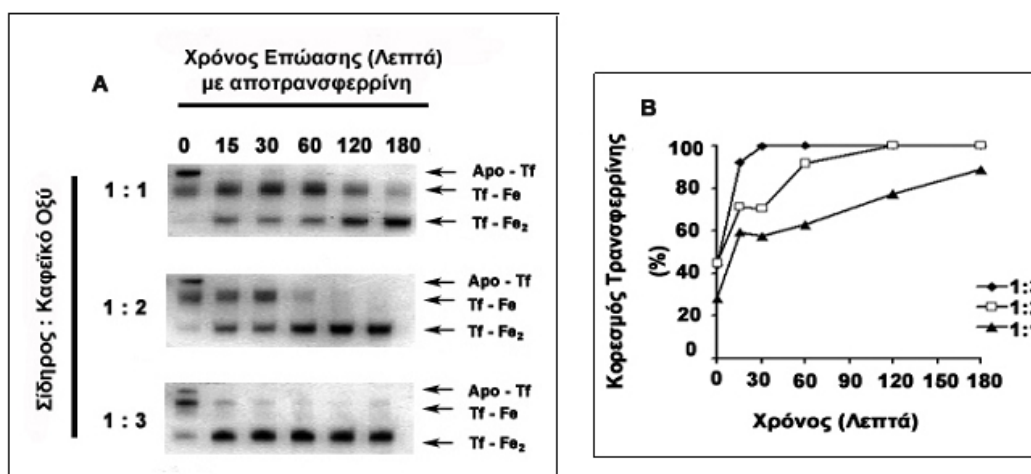
**Εικόνα 30. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφερασιρόξης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu$ M) επώαστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφερασιρόξης σε αναλογίες 1:1 και 1:2 (σιδήρου:δεφερασιρόξης) για 30 λεπτά. Ακολούθως, καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu$ M) προστέθηκε στο διάλυμα για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 180 λεπτά) και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δέσμευση του σιδήρου σε αυτή με ηλεκτροφόρηση U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Αντιθέτως, στο σύμπλοκο σιδήρου:δεσφериοξαμίνης που ήταν σε αναλογία 1:1, η τρανσφερρίνη δε δέσμευσε το σίδηρο του συμπλόκου και έτσι ανιχνεύθηκε κυρίως ως αποτρανσφερρίνη (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Συνοψίζοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα, καθίσταται εμφανές ότι η ικανότητα της τρανσφερρίνης να δεσμεύει σίδηρο εξαρτάται από το είδος του φαρμακευτικού σκευάσματος που περιέχεται στο σύμπλοκο. Ωστόσο, στην περίπτωση της δεφεριπρόνης, η αναλογία σιδήρου:δεφεριπρόνης φαίνεται να αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που επηρεάζει την ικανότητα αυτή.

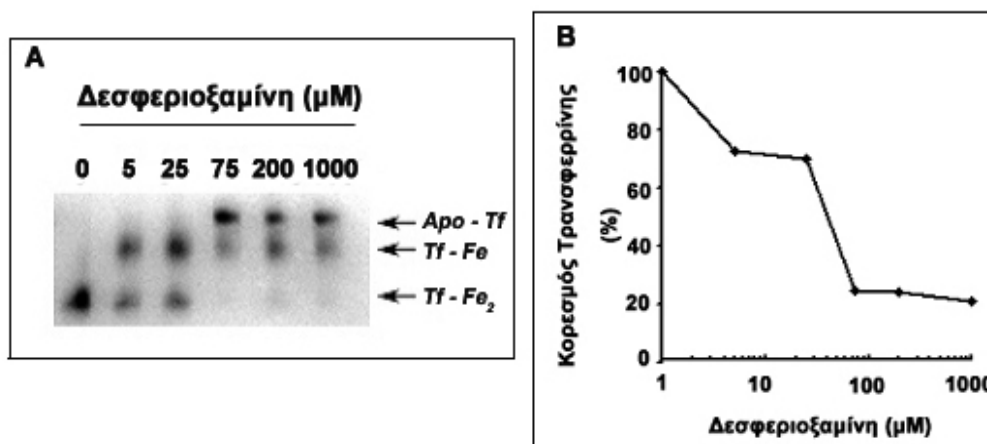


Όσον αφορά την περίπτωση του συμπλόκου σιδήρου:καφεϊκού οξέος που ήταν σε αναλογία 1:1, δεν υπήρξε πλήρης μετατροπή της τρανσφερρίνης στη δισιδηρική μορφή σε κανένα από τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (εικόνα 31A). Η μέγιστη τιμή του κορεσμού της ήταν 80% (εικόνα 31B). Αντίθετα, στο σύμπλοκο σιδήρου:καφεϊκού οξέος που ήταν σε αναλογία 1:2, παρατηρήθηκε δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την προηγούμενη αναλογία, καθώς μετά το πέρας των 60 λεπτών επώασης η τρανσφερρίνη είχε μετατραπεί εξ ολοκλήρου στη δισιδηρική μορφή, αφού είχε προσλάβει ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που ήταν δεσμευμένη στο καφεϊκό οξύ (εικόνα 31A). Η μέγιστη τιμή του κορεσμού της ήταν 95% (εικόνα 31B). Στο σύμπλοκο σιδήρου:καφεϊκού οξέος που ήταν σε αναλογία 1:3, η τρανσφερρίνη από τα 15 πρώτα λεπτά της επώασης είχε μετατραπεί εξ ολοκλήρου στη δισιδηρική μορφή (εικόνα 31Γ). Γίνεται φανερό, λοιπόν, ότι σε αντίθεση με την περίπτωση της δεφεριπρόνης, όσο αυξάνει η συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος σε σχέση με το σίδηρο, τόσο αυξάνεται και η ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου.



**Εικόνα 31. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία καφεϊκού οξέος.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu$ M) επώαστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος σε αναλογίες 1:1, 1:2 και 1:3 (σιδήρου:καφεϊκού οξέος) για 30 λεπτά. Ακολούθως, καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu$ M) προστέθηκε στο διάλυμα για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 180 λεπτά) και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δέσμευση του σιδήρου σε αυτή με ηλεκτροφόρηση U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της δεσφериοξαμίνης στην ικανότητα της τρανσφερρίνης να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης, καθώς ο συνδυασμός των δύο αυτών φαρμακευτικών σκευασμάτων παρουσιάζεται συχνά στην κλινική πράξη. Αρχικά, δημιουργήθηκε το σύμπλοκο σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:1 και ακολούθως προστέθηκαν σε αυτό καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu\text{M}$ ) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) για δυο ώρες. Η επιλογή της συγκεκριμένης αναλογίας σιδήρου:δεφεριπρόνης 1:1 βασίστηκε στα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία στην αναλογία αυτή η τρανσφερρίνη είχε τη δυνατότητα να δεσμεύσει ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που βρισκόταν στο σύμπλοκο. Σύμφωνα με την εικόνα 32, απουσία της δεσφериοξαμίνης η τρανσφερρίνη διατήρησε την ικανότητά της να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου και να μετατρέπεται εξ ολοκλήρου σε δισιδηρική.

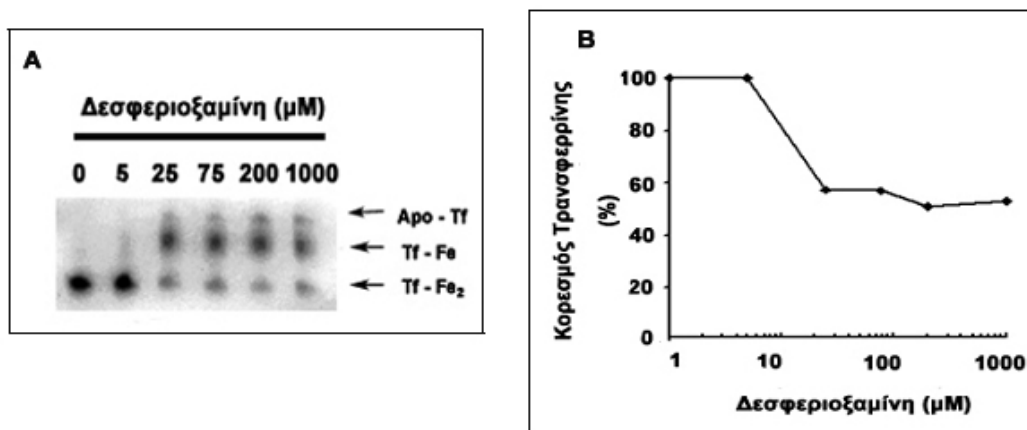


**Εικόνα 32. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία δεφεριπρόνης και δεσφериοξαμίνης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu\text{M}$ ) επώαστηκε με 50  $\mu\text{M}$  δεφεριπρόνης για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκε στο διάλυμα καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu\text{M}$ ) μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) για δυο ώρες και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη με ηλεκτροφόρηση U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Αντιθέτως, η παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφериοξαμίνης οδήγησε στη σταδιακή μείωση της δέσμευσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη καθώς αυτή, από τη συγκέντρωση 75  $\mu\text{M}$  δεσφериοξαμίνης και άνω, ανιχνεύθηκε κυρίως ως

αποτρανσφερρίνη. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη δέσμευση του σιδήρου από το μόριο της δεσφериοξαμίνης και όχι από την τρανσφερρίνη.

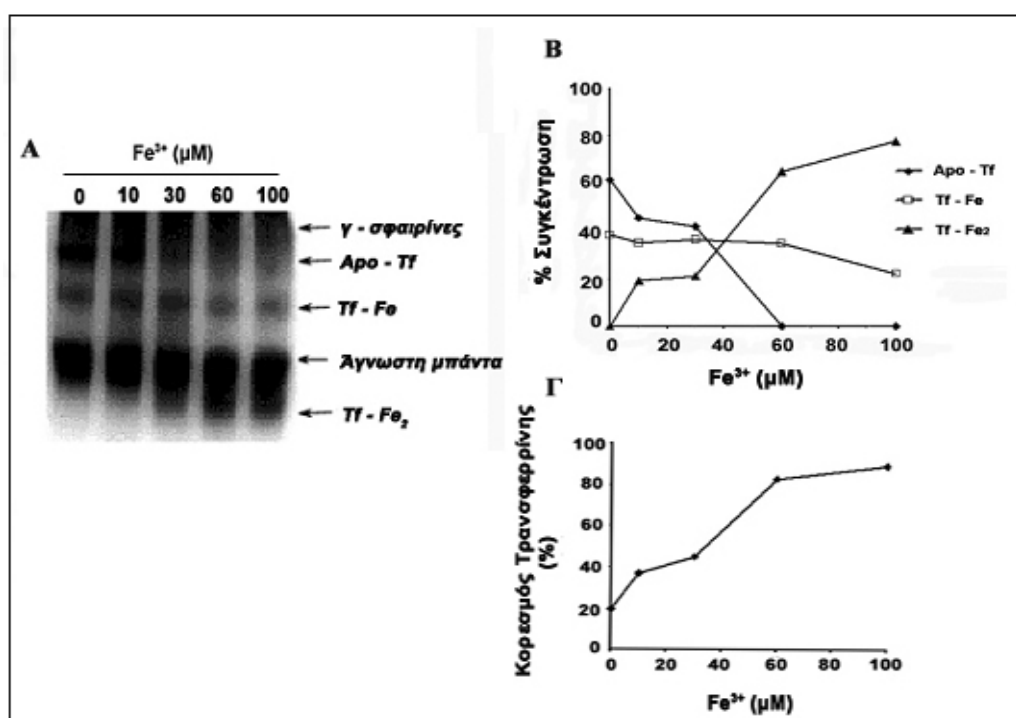
Ακολούθως, ελέγχθηκε με παρόμοιο τρόπο η επίδραση της δεσφериοξαμίνης στην ικανότητα της τρανσφερρίνης να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:καφεϊκού οξέος. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε το σύμπλοκο σιδήρου:καφεϊκού οξέος που ήταν σε αναλογία 1:3 και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτό καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu\text{M}$ ) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) για δυο ώρες. Η επιλογή της συγκεκριμένης αναλογίας σιδήρου:καφεϊκού οξέος 1:3 βασίστηκε στα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία στην αναλογία αυτή η τρανσφερρίνη είχε τη δυνατότητα να δεσμεύσει ολόκληρη την ποσότητα του σιδήρου που βρισκόταν στο σύμπλοκο. Σύμφωνα με την εικόνα 33, απουσία της δεσφериοξαμίνης η τρανσφερρίνη διατήρησε την ικανότητά της να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου και να μετατρέπεται εξ ολοκλήρου σε δισιδηρική. Ωστόσο, η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφериοξαμίνης οδήγησε, όπως και στην περίπτωση της δεφериπρόνης, σε σταδιακή μείωση της δέσμευσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη καθώς αυτή, από τη συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  δεσφериοξαμίνης και άνω, ανιχνεύθηκε ως αποτρανσφερρίνη.



**Εικόνα 33. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσία καφεϊκού οξέος και δεσφериοξαμίνης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu\text{M}$ ) επωάστηκε με 150  $\mu\text{M}$  καφεϊκού οξέος για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκε στο διάλυμα καθαρή αποτρανσφερρίνη (25  $\mu\text{M}$ ) μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) για δυο ώρες και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη με ηλεκτροφόρηση U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

### 3.1.4. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού

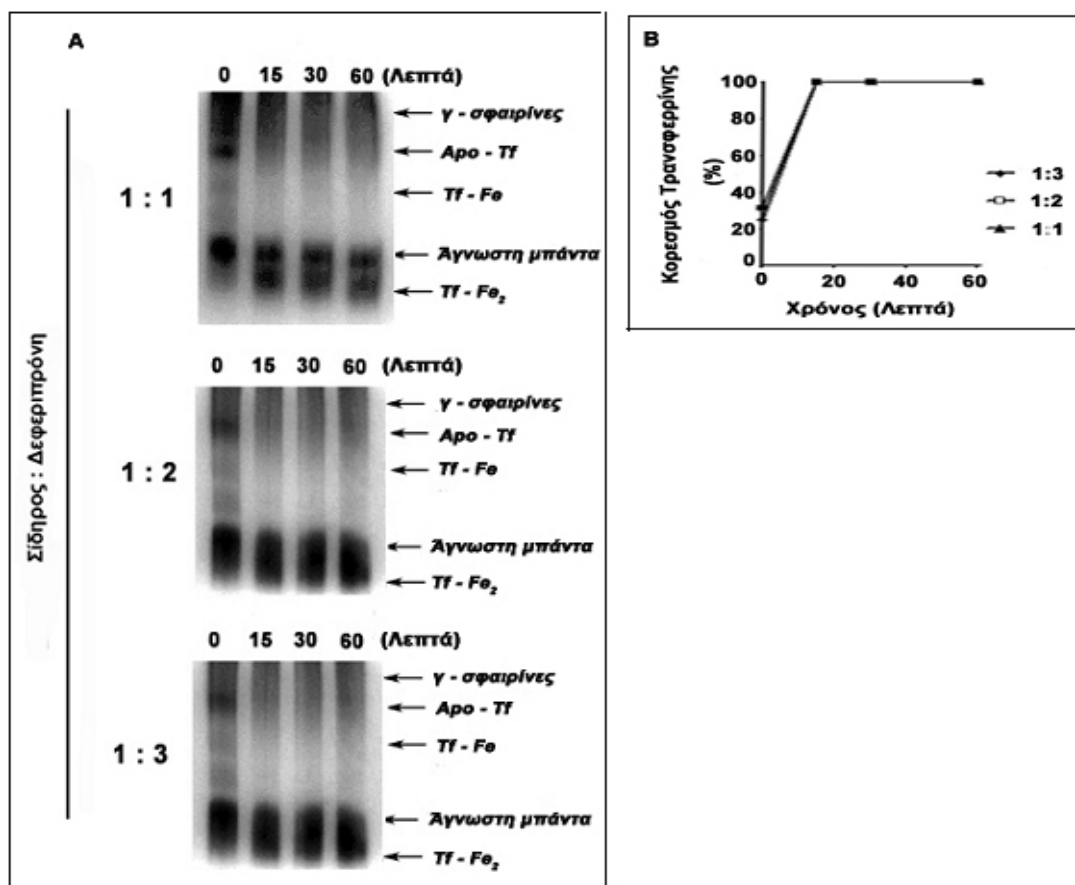
Στη συνέχεια, τα προηγούμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ορό αίματος, προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη κατανόηση της *in vivo* δράσης των ανώτερων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται εφικτός ο έλεγχος της επίδρασης διαφόρων συστατικών του ορού στην ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στα φαρμακευτικά σκευάσματα. Ωστόσο, στην περίπτωση του ορού, η ανίχνευση των διαφορετικών μορφών τρανσφερρίνης απαιτεί την επώαση των δειγμάτων με την ουσία *rinanol lactate* (2,5-diamino-7 ethoxyacridine), ώστε να κατακρημνιστούν η αλβουμίνη και το μεγαλύτερο μέρος των β-σφαιρινών. Οι β-σφαιρίνες που δεν κατακρημνίζονται, συμπεριλαμβανομένης της τρανσφερρίνης, μένουν ανέπαφες στο υπερκείμενο μαζί με τις γ-σφαιρίνες. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η τρανσφερρίνη του ορού εμφανίζει διαφορετική κινητικότητα από τις γ-σφαιρίνες με αποτέλεσμα να μην εμποδίζεται η ανίχνευσή της (εικόνα 34A).



**Εικόνα 34.** Αύξηση του κορεσμού τρανσφερρίνης ορού μετά την προσθήκη διαλύματος τρισθενούς σιδήρου. Δείγματα ορού επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος τρισθενούς σιδήρου (10, 30, 60 και 100 μM) για 15 λεπτά και στη συνέχεια μέσω ηλεκτροφόρησης U-PAGE παρατηρήθηκε η δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού (A, B, Γ).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, απουσία τρισθενούς σιδήρου η τρανσφερρίνη ορού ανιχνεύεται κυρίως ως αποτρανσφερρίνη και ως μονοσιδηρική με τον κορεσμό της να φτάνει σε ποσοστό 20%. Η ακόλουθη προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων διαλύματος τρισθενούς σιδήρου (10, 30, 60 και 100  $\mu\text{M}$ ) οδηγεί στη σταδιακή μετατροπή της τρανσφερρίνης ορού στη δισιδηρική μορφή και στην ανάλογη αύξηση του κορεσμού της.

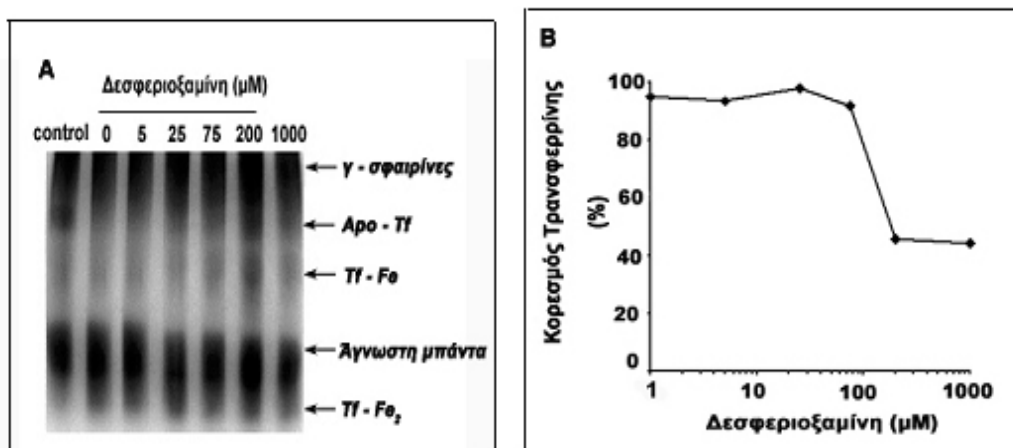
Για τη μελέτη, λοιπόν, της ικανότητας της τρανσφερρίνης ορού να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στη δεφεριπρόνη, δημιουργήθηκαν σύμπλοκα σιδήρου:δεφεριπρόνης σε αναλογίες 1:1, 1:2 και 1:3 που επωάστηκαν με ορό για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 60 λεπτά) (εικόνα 35).



**Εικόνα 35. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού παρουσία δεφεριπρόνης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu\text{M}$ ) επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης σε αναλογίες 1:1, 1:2 και 1:3 (σιδήρου:δεφεριπρόνης) για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκε ορός για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 60 λεπτά) και μέσω ηλεκτροφόρησης U-PAGE (A) παρατηρήθηκε η δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού. Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Όσον αφορά την περίπτωση του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:1, η αποτρανσφερρίνη του ορού μετατράπηκε εξ ολοκλήρου στη δισιδηρική μορφή από τα 15 πρώτα λεπτά της επώασης (εικόνα 35). Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στις περιπτώσεις των συμπλόκων σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογίες 1:2 και 1:3. Ωστόσο, τα πειραματικά αυτά δεδομένα έρχονται σε αντίθεση με εκείνα των πειραμάτων με την καθαρή αποτρανσφερρίνη, καταδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την επίδραση διαφόρων συστατικών του ορού στην ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στη δεφεριπρόνη.

Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα της τρανσφερρίνης ορού να δεσμεύει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης που ήταν σε αναλογία 1:1 παρουσία της δεσφεριοξαμίνης (εικόνα 36). Απουσία δεσφεριοξαμίνης η τρανσφερρίνη ανιχνεύθηκε κυρίως ως δισιδηρική, γεγονός που υποδεικνύει τη δέσμευση του σιδήρου του συμπλόκου στην τρανσφερρίνη. Αντιθέτως, η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφεριοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μετατροπή της δισιδηρικής τρανσφερρίνης σε μονοσιδηρική και τελικά σε αποτρανσφερρίνη, καθώς ο σίδηρος του συμπλόκου δεσμευόταν στο μόριο της δεσφεριοξαμίνης και όχι στην τρανσφερρίνη.



**Εικόνα 36. Απόδοση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού παρουσία δεφεριπρόνης και δεσφεριοξαμίνης.** Διάλυμα τρισθενούς σιδήρου (50  $\mu\text{M}$ ) επώαστηκε με δεφεριπρόνη (50  $\mu\text{M}$ ) για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε ορός μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (5, 25, 75, 200 και 1000  $\mu\text{M}$ ) για 1 ώρα. Ακολούθως, παρατηρήθηκε η δέσμευση του σιδήρου στην τρανσφερρίνη ορού μέσω ηλεκτροφόρησης U-PAGE (A). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης (%) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One με βάση την εξής φόρμουλα:  $([\text{Diferic-Tf}] + 0.5 \times [\text{Monoferric-Tf}]) \times 100$  (B).

Από τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους των πειραμάτων γίνεται εμφανές ότι οι διάφορες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις έχουν διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά: α) τον τρόπο εισόδου τους στα κύτταρα, β) την ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο και γ) την ικανότητά τους να αποδίδουν το σίδηρο αυτό στην τρανσφερρίνη. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας τις παραπάνω μεθοδολογίες πιστεύεται ότι στο μέλλον θα εντοπιστούν ενώσεις με καταλληλότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που θα επιτρέπουν τη βέλτιστη κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου.

## Μέρος Β

### 3.2. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αναπτύχθηκε επίσης μια νέα μεθοδολογία για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κύτταρα του περιφερικού αίματος ανθρώπου. Η νέα μέθοδος, έχοντας ως βάση την προϋπάρχουσα μεθοδολογία για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κυτταρικές καλλιέργειες [Epsztejn S. et al., 1997], στηρίζεται στα μοναδικά πλεονεκτήματα που προσφέρει η σύγχρονη τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων μοναδιαίων κυττάρων που ρέουν μέσα σε μια συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων.

Σε μια πρώτη φάση, ο διαχωρισμός και η ανάλυση των διαφόρων τύπων κυττάρων του περιφερικού αίματος βασίζονται στον πρόσθιο (Forward Scatter) και πλάγιο σκεδασμό (Side Scatter), που αντιπροσωπεύουν το μέγεθος και την κοκκίωση (πυκνότητα εσωτερικού τους περιεχομένου) των κυττάρων, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό, επιτρέπεται ο ηλεκτρονικός διαχωρισμός του πληθυσμού που μας ενδιαφέρει χωρίς να απαιτείται η απομόνωση του κάθε είδους κυττάρου χωριστά. Η οριοθέτηση του κάθε πληθυσμού επιτυγχάνεται μέσω μιας περίφραξης (gating) που σχηματίζεται γύρω από αυτόν.

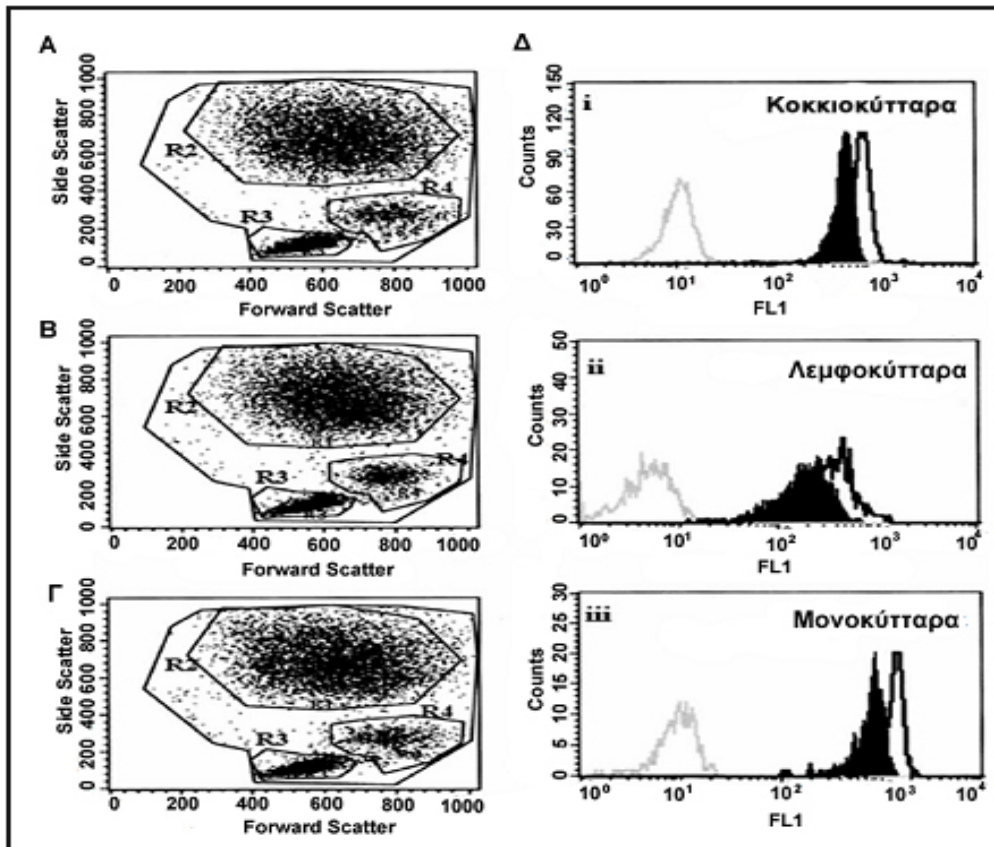
Το επόμενο βήμα για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κάθε ένα τύπο κυττάρων του περιφερικού αίματος περιλαμβάνει τη χρήση της ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνη, της οποίας ο τρόπος δράσης έχει περιγραφεί προηγουμένως [Epsztejn S. et al., 1997; Tenopoulou M. et al., 2005; Tenopoulou M. et al., 2007].



### 3.2.1. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος

Σε ένα πρώτο στάδιο, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα του LIP σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος. Ο ολικός πληθυσμός των λευκοκυττάρων απομονώθηκε μετά από υπο-ωσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων. Μια ποσότητα ολικού περιφερικού αίματος αναμειγνύεται στην κατάλληλη αναλογία με διάλυμα λύσης (156 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  και 97  $\mu\text{M}$  EDTA), ώστε να επιτευχθεί η λύση των ερυθροκυττάρων [Takizawa M. et al., 2006]. Η μετέπειτα ανάλυση του πρόσθιου και του πλάγιου σκεδασμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής οδήγησε στον προσδιορισμό των διαφορετικών υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων (κοκκιοκύτταρα (R2), λεμφοκύτταρα (R3) και μονοκύτταρα (R4)) (εικόνα 37A). Σύμφωνα με τις τιμές του πλάγιου και πρόσθιου σκεδασμού των κυττάρων, ο υποπληθυσμός των κοκκιοκυττάρων, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσίαζε τη μεγαλύτερη κοκκίωση, των μονοκυττάρων το μεγαλύτερο μέγεθος, ενώ των λεμφοκυττάρων είχε τη μικρότερη κοκκίωση και το μικρότερο μέγεθος.

Η εκτίμηση των επιπέδων του LIP για κάθε ένα τύπο λευκοκυττάρων έγινε με τη χρήση της καλσεΐνης-AM, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η επώαση των λευκοκυττάρων με την καλσεΐνη-AM δεν είχε καμία επίπτωση στις φυσικές ιδιότητες των λευκοκυττάρων (εικόνα 37B). Αντιθέτως, οδήγησε σε αύξηση της έντασης του φθορισμού (εικόνα 37Δ, γεμάτο ιστόγραμμα) σε σχέση με το βασικό φθορισμό που παρουσίαζαν τα κύτταρα πριν την προσθήκη της καλσεΐνης (εικόνα 37Δ, άδειο ιστόγραμμα με γκρι γραμμή) και στους τρεις τύπους λευκοκυττάρων. Η επακόλουθη προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH δεν επηρέασε τις παραμέτρους σκεδασμού των διαφορετικών υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων (εικόνα 37Γ), ενώ προκάλεσε μια περαιτέρω αύξηση του φθορισμού των κυττάρων (εικόνα 37Δ, άδειο ιστόγραμμα με μαύρη γραμμή). Η αύξηση αυτή του φθορισμού της καλσεΐνης που καταγράφηκε μετά την προσθήκη του SIH, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του LIP που δεσμεύει η καλσεΐνη σε κάθε τύπο κυττάρων (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα).

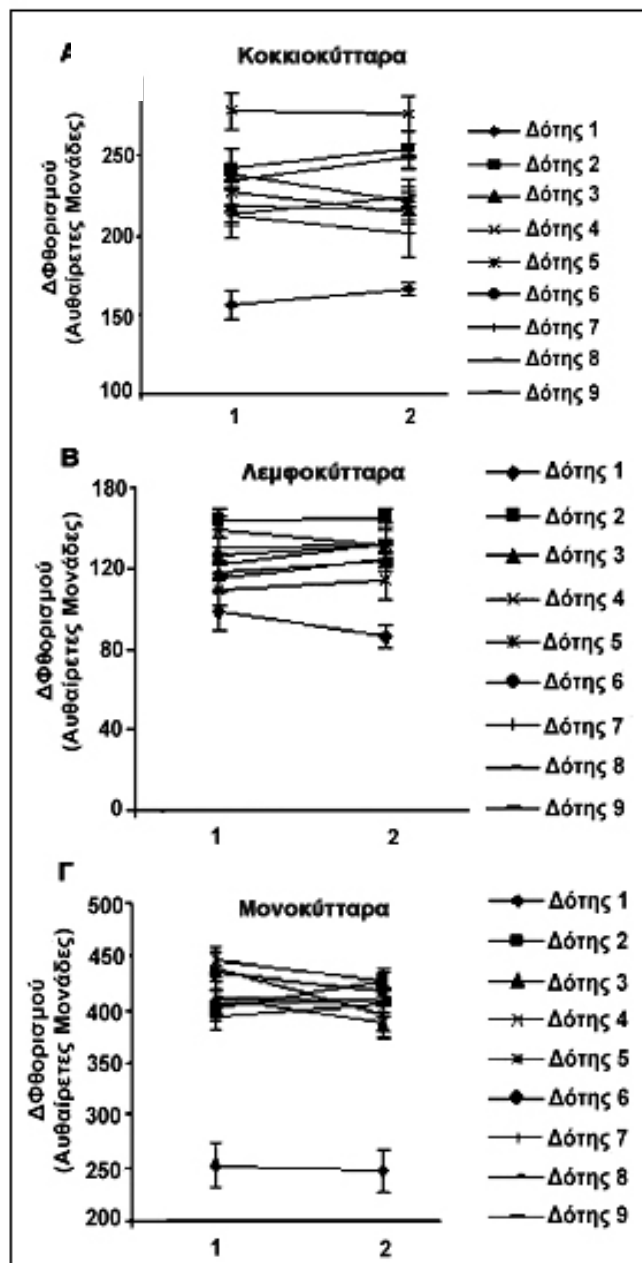


**Εικόνα 37.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής. Λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ( $1.5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) διαχωρίστηκαν με βάση το μέγεθος (Forward Scatter) και την κοκκίωση (Side Scatter) σε τρεις διαφορετικούς υποπληθυσμούς (Α). Η επώαση των λευκοκυττάρων με 5 nM καλσεΐνης-AM για δέκα λεπτά δεν επηρέασε τις παραμέτρους σκεδασμού των κυττάρων (Β), ενώ οδήγησε σε αύξηση της έντασης του φθορισμού (γεμάτα ιστογράμματα) σε σχέση με το βασικό φθορισμό των κυττάρων πριν την προσθήκη της καλσεΐνης-AM (άδειο ιστόγραμμα με γκρι γραμμή). Η μετέπειτα προσθήκη του SIH (100  $\mu$ M) στο ίδιο κυτταρικό εναιώρημα για πέντε λεπτά δεν είχε καμία επίπτωση στο διαχωρισμό των κυττάρων (Γ), ενώ προκάλεσε μια περαιτέρω αύξηση της έντασης του φθορισμού (άδειο ιστόγραμμα με μαύρη γραμμή). Η αύξηση αυτή στο μέσο φθορισμό των κυττάρων μετά την προσθήκη του SIH, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του σιδήρου που δεσμεύονται από την καλσεΐνη. Στα στικτογράμματα (Α, Β και Γ), η ομάδα R2 αντιπροσωπεύει τα κοκκιοκύτταρα, η R3 τα λεμφοκύτταρα και η R4 τα μονοκύτταρα.

Ο μέσος όρος των επιπέδων του LIP που καταγράφηκε για τέσσερις υγιείς δότες ήταν  $208.5 \pm 15.3$ ,  $115.3 \pm 10.5$  και  $350.5 \pm 30.8$  αυθαίρετες μονάδες για τον πληθυσμό των κοκκιοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις τιμές αυτές, ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσίαζε τα υψηλότερα επίπεδα LIP, των λεμφοκυττάρων τα μικρότερα, ενώ των κοκκιοκυττάρων βρισκόταν ενδιάμεσα. Φαίνεται λοιπόν ότι οι διάφοροι τύποι λευκοκυττάρων διαφέρουν ως προς την ποσότητα του LIP που περιέχουν. Παρά την έλλειψη σχετικών μελετών, η αυξημένη ποσότητα του LIP στον πληθυσμό των μονοκυττάρων είναι πιθανό να σχετίζεται με την εντονότερη φαγοκυτταρική ικανότητα των κυττάρων αυτών καθώς και με τη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε υδρολυτικά ένζυμα, που έχουν ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό διαφόρων μορίων και την αποδέσμευση του σιδήρου από αυτά. Επιπρόσθετα, η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται και σε άλλες παραμέτρους, όπως είναι το μέγεθος και η διαμερισματοποίηση του κάθε κυττάρου.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της νέας μεθόδου πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος σε δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα στη διάρκεια μιας ημέρας. Οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων που καταγράφηκαν από τους μέσους όρους τεσσάρων μετρήσεων του ίδιου δείγματος στα δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ήταν 4.3%, 5.3% και 3.7% για τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα.

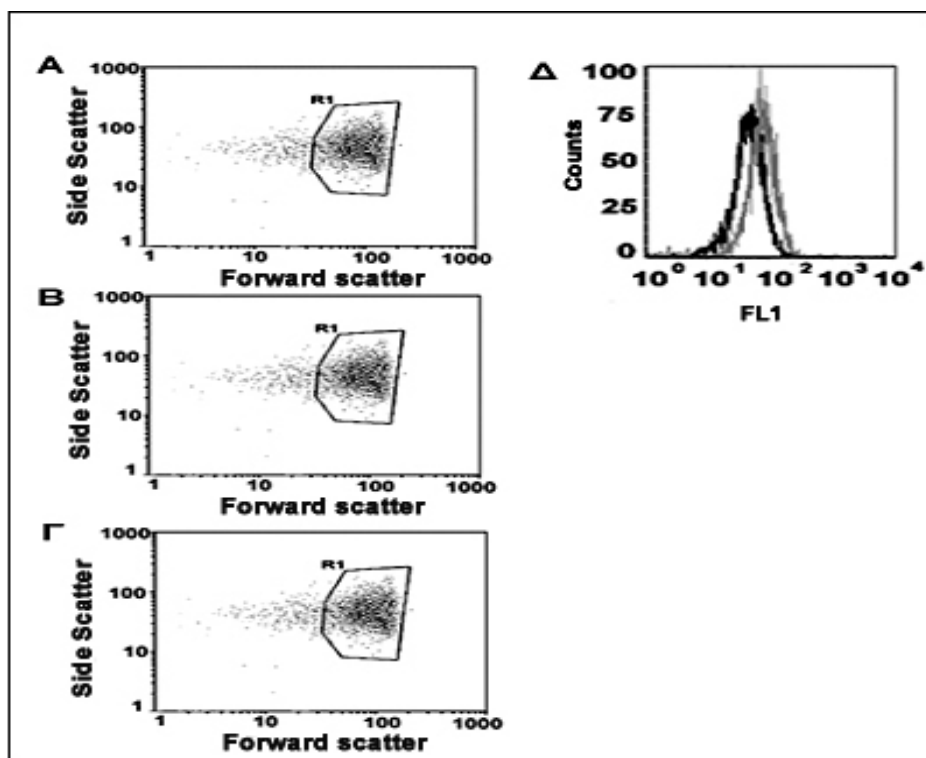
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι παρόμοιες τιμές σημειώθηκαν ακόμη και σε μετρήσεις δύο διαφορετικών δειγμάτων του ίδιου δότη που ελήφθησαν με διαφορά επτά ημερών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 38 (Α, Β και Γ), οι τιμές των επιπέδων του LIP, εκφρασμένες σε αυθαίρετες μονάδες, διατηρούνται σχετικά σταθερές για τον κάθε δότη μεταξύ των δύο αυτών χρονικών σημείων και στους τρεις τύπους κυττάρων. Έτσι, άτομα τα οποία αρχικά παρουσίαζαν σχετικά χαμηλά επίπεδα LIP, παρέμεναν σε αυτά μετά το πέρας των επτά ημερών. Το ίδιο διαπιστώθηκε και στην περίπτωση των ατόμων με υψηλότερα επίπεδα LIP. Η παρατήρηση αυτή αντικατοπτρίζει τον ενεργό ρόλο μηχανισμών ρύθμισης τόσο σε επίπεδο οργανισμού όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.



**Εικόνα 38.** Διατήρηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP). Λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ( $1.5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) από υγιείς δότες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP. Στα διαγράμματα Α έως Γ, οι τιμές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τις τιμές Δφθορισμού του ίδιου δότη την πρώτη και την έβδομη ημέρα για τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων του ίδιου δείγματος. Τα επίπεδα του LIP διατηρούνται σχετικά σταθερά κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

### 3.2.2. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στα ερυθροκύτταρα

Η εκτίμηση των επιπέδων του LIP στα ερυθροκύτταρα αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης. Ο πληθυσμός των ερυθροκυττάρων συλλέχθηκε με τη μορφή ιζήματος μετά από ήπια φυγοκέντρηση ολικού περιφερικού αίματος. Τα φυσικά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων, μέγεθος και κοκκίωση, επέτρεψαν τον εντοπισμό του πληθυσμού στο αντίστοιχο διπαραμετρικό διάγραμμα κυτταρομετρίας ροής (εικόνα 39Α).



Εικόνα 39. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στα ερυθροκύτταρα με κυτταρομετρία ροής. Ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, ως προς το μέγεθος και την κοκκίωσή τους (Α). Ακολούθως, επώστηκαν με 5 nM καλσεΐνης-AM για δέκα λεπτά και αμέσως μετά αναλύθηκαν και πάλι με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά αλλά και την ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης (Β και μαύρη γραμμή ιστογράμματος στο Δ). Έπειτα, 100 μM SIH προστέθηκαν στο ίδιο κυτταρικό εναιώρημα και πέντε λεπτά αργότερα τα κύτταρα αναλύθηκαν για τις ίδιες παραμέτρους (Γ και γκρι γραμμή ιστογράμματος στο Δ). Η αύξηση στο μέσο φθορισμό των κυττάρων μετά την προσθήκη του SIH εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες και αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του LIP που δεσμεύονται από την καλσεΐνη.

Τα αποτελέσματα της επώασης των ερυθροκυττάρων τόσο με την καλσεΐνη-AM όσο και με το SIH καταγράφηκαν με τρόπο όμοιο με αυτόν της περίπτωσης των λευκοκυττάρων. Η διαφορά στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης πριν (εικόνα 39Δ, μαύρη γραμμή ιστογράμματος) και μετά την προσθήκη του ισχυρού σιδηροδεσμευτή SIH (εικόνα 39Δ, γκρι γραμμή ιστογράμματος) οδήγησε στον προσδιορισμό των επιπέδων του LIP για τον πληθυσμό των ερυθροκυττάρων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση των ερυθροκυττάρων η προσθήκη των προηγούμενων ενώσεων δεν είχε καμία επίπτωση στις παραμέτρους σκεδασμού των κυττάρων (εικόνα 39B και 39Γ, αντίστοιχα).

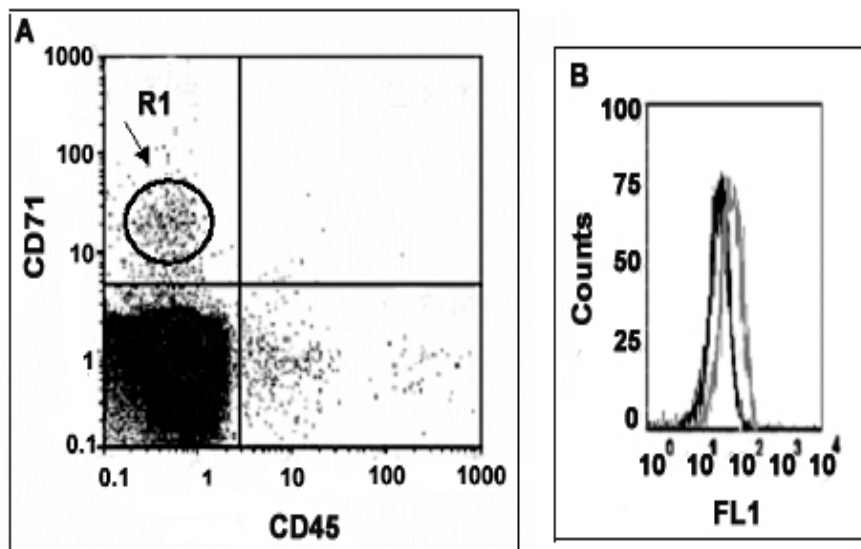
Ο μέσος όρος των επιπέδων του LIP των ερυθροκυττάρων που καταγράφηκε για τέσσερις υγιείς δότες ήταν  $40.5 \pm 10.6$  αυθαίρετες μονάδες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των επιπέδων του LIP του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων με εκείνα των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων. Από τη σύγκριση αυτή φαίνεται καθαρά ότι τα επίπεδα του LIP ήταν σαφέστατα χαμηλότερα στην περίπτωση των ερυθροκυττάρων. Πιθανώς η παρατήρηση αυτή να σχετίζεται με το πολύ μικρό μέγεθος των ερυθροκυττάρων.

### **3.2.3. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε δικτυοερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος**

Τα δικτυοερυθροκύτταρα αποτελούν πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων που απελευθερώνονται από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία του αίματος. Εκεί παραμένουν για λίγες μόνο ημέρες πριν τη μετατροπή τους σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αποτελούν το 0.5-2% των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα να υπάρχουν δυσκολίες στον εντοπισμό τους και να απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων.

Στην παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των δικτυοερυθροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα, το οποίο φυγοκεντρήθηκε με σκοπό τη συλλογή του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων. Ακολούθησε αραίωση του πληθυσμού και επώαση με τα αντισώματα CD71 και CD45 που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη βιβλιογραφία για τον εντοπισμό των δικτυοερυθροκυττάρων. Ο κυτταρικός πληθυσμός τους αναλύθηκε με βάση την παρουσία του δείκτη CD71 που αντιπροσωπεύει τον υποδοχέα τρανσφερρίνης-1 στην

επιφάνεια των δικτυοερυθροκυττάρων και την απουσία του δείκτη CD45 που καθορίζει τα λευκοκύτταρα (εικόνα 40A). Ως πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων, τα δικτυοερυθροκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους ένα σημαντικό αριθμό υποδοχέων τρανσφερίνης-1, ώστε να εισάγουν στο εσωτερικό τους την απαιτούμενη ποσότητα σιδήρου μέσω της τρανσφερίνης για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Η έκφραση του δείκτη CD71 για τον υποδοχέα τρανσφερίνης-1 μειώνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των δικτυοερυθροκυττάρων, ενώ απουσιάζει εντελώς από τα ώριμα ερυθροκύτταρα [Loken et al., 1987]. Κατά συνέπεια, ο πληθυσμός των δικτυοερυθροκυττάρων πρέπει να είναι θετικός στην έκφραση του δείκτη CD71, αλλά ταυτόχρονα και αρνητικός στην έκφραση του δείκτη των λευκοκυττάρων CD45 (R1, στικτόγραμμα εικόνας 40A).



**Εικόνα 40.** Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε δικτυοερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής. Δείγματα ολικού περιφερικού αίματος αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, με βάση την παρουσία του δείκτη CD71 και την απουσία του δείκτη CD45 (A). Τα δικτυοερυθροκύτταρα ακολούθως επώαστηκαν με 5 nM καλσεΐνης-AM για δέκα λεπτά και η ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης αποτυπώθηκε στο ιστόγραμμα B (μαύρη γραμμή). Έπειτα, 100  $\mu$ M SIH προστέθηκαν στο ίδιο κυτταρικό εναιώρημα και πέντε λεπτά αργότερα καταγράφηκε η αύξηση στο φθορισμό (γκρι γραμμή). Στο στικτόγραμμα A, η ομάδα R1 αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό των δικτυοερυθροκυττάρων. Η αύξηση στο μέσο φθορισμό των κυττάρων μετά την προσθήκη του SIH, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του σιδήρου που δεσμεύονται από την καλσεΐνη.

Ακολουθώς, τα κύτταρα επωάστηκαν με καλσεΐνη-AM και ο φθορισμός της καλσεΐνης αποτυπώθηκε στο ιστογράμμα της εικόνας 40B (μαύρη γραμμή ιστογράμματος). Η μετέπειτα προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού (εικόνα 40B, γκρι γραμμή ιστογράμματος). Η αύξηση που καταγράφηκε, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, αντιπροσωπεύει τα επίπεδα του LIP στον πληθυσμό των δικτυοερυθροκυττάρων.

Ο μέσος όρος των επιπέδων του LIP για τον πληθυσμό των δικτυοερυθροκυττάρων που καταγράφηκε για τέσσερις διαφορετικούς υγιείς δότες ήταν  $90.9 \pm 6.4$  αυθαίρετες μονάδες. Σύμφωνα με την τιμή αυτή, ο πληθυσμός των δικτυοερυθροκυττάρων διαπιστώθηκε ότι παρουσίαζε μεγαλύτερα επίπεδα LIP σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων. Το γεγονός αυτό αντανακλά τη μείωση των επιπέδων του LIP κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας [Prus E. and Fibach E., 2008].

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του LIP στον πληθυσμό των δικτυοερυθροκυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς επιτρέπει την έγκαιρη εκτίμηση των διαθέσιμων επιπέδων σιδήρου για τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Κατά συνέπεια, σε περιπτώσεις μη αποτελεσματικής ερυθροποίησης το LIP των δικτυοερυθροκυττάρων αποτελεί έναν πιο πρώιμο διαγνωστικό δείκτη σε σχέση με τους υπόλοιπους δείκτες που ήδη χρησιμοποιούνται, όπως ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη, ο σίδηρος του ορού, η φερριτίνη και ο κορεσμός τρανσφερρίνης.



## Μέρος Γ

### 3.3. Θετική συσχέτιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με την ηλικία

Στο τρίτο μέρος της μελέτης ακολούθησε ο προσδιορισμός των επιπέδων του LIP σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος από σαράντα ένα υγιείς δότες με στόχο τη διερεύνηση της σχέσης του LIP με την ηλικία των δοτών και κατά συνέπεια την πιθανή εμπλοκή του στη διαδικασία της γήρανσης. Τα δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το σίδηρο σε υγιείς δότες.**

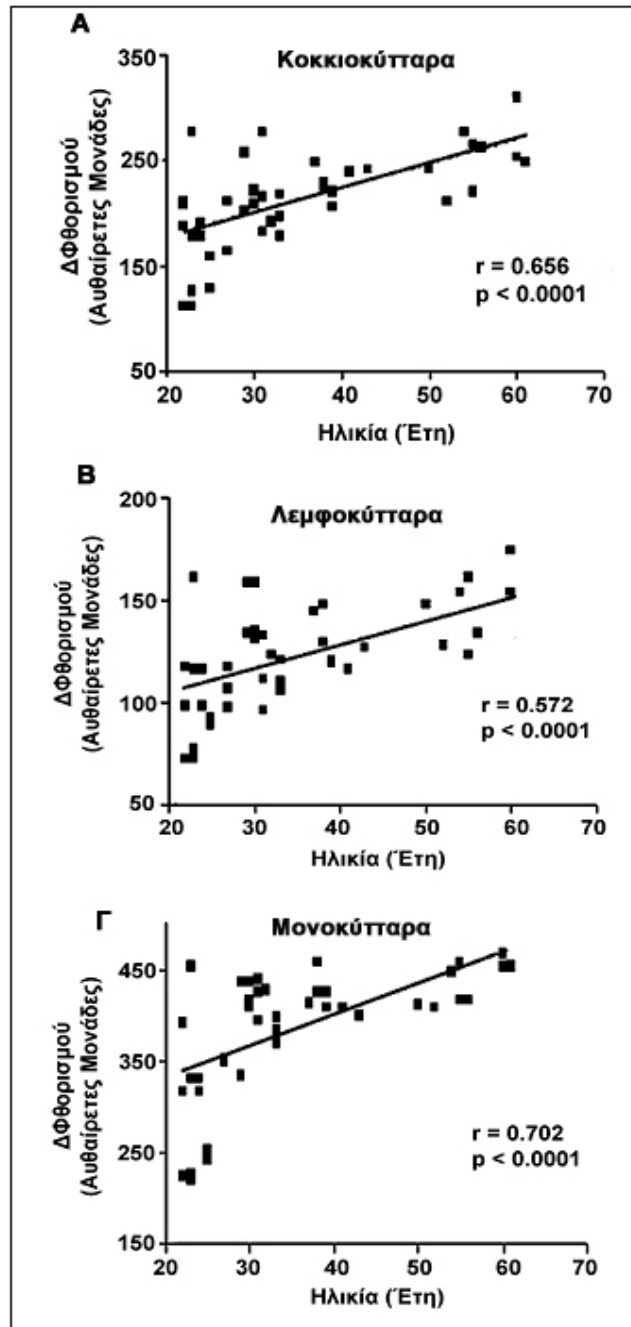
Μέσος όρος ηλικίας (Ετη)*	35.7 ± 12.2 (εύρος τιμών 22-61)
Φύλο (Άρρεν/Θήλυ)	20/21
<b>Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) (αυθαίρετες μονάδες)</b>	
<i>Κοκκιοκύτταρα</i>	214.4 ± 43.1
<i>Μονοκύτταρα</i>	386.8 ± 66.3
<i>Λεμφοκύτταρα</i>	124.0 ± 23.4
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13.8 ± 1.4
Αιματοκρίτης (%)	43.0 ± 3.6
Σίδηρος ορού (μg/dl)	101.0 ± 67.7
Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα τρανσφερρίνης (Total Iron Binding Capacity, TIBC) (μmol/L)	332.3 ± 31.0
Κορεσμός τρανσφερρίνης (%)**	30.4 ± 14.6
Φερριτίνη ορού (ng/ml)	72.1 ± 76.4

\* Μέσος Όρος ± τυπική απόκλιση, n=41 \*\* Ο κορεσμός τρανσφερρίνης υπολογίζεται με την εξής φόρμουλα: Κορεσμός τρανσφερρίνης (%) = [(σίδηρος ορού)/(TIBC)] x 100

Οι παράμετροι που σχετίζονται με το σίδηρο αναλύθηκαν με εργαστηριακές μεθόδους ρουτίνας και παρουσίασαν φυσιολογικές τιμές. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος για την αιμοσφαιρίνη ήταν  $13.8\text{g/dl} \pm 1.4$ , για τον αιματοκρίτη  $43.0\% \pm 3.6$ , για το σίδηρο του ορού  $101.0\mu\text{g/dl} \pm 67.7$ , για την ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα τρανσφερρίνης (Total Iron Binding Capacity, TIBC)  $323.3\mu\text{mol/l} \pm 31.0$ , για τον κορεσμό τρανσφερρίνης  $30.4\% \pm 14.4$  ενώ για τη φερριτίνη του ορού  $72.1\text{ng/ml} \pm 76.4$  (πίνακας 3).

Όσον αφορά το μέσο όρο των επιπέδων του LIP, που καταγράφηκε για τους συγκεκριμένους δότες, αυτός ήταν:  $214.4 \pm 43.1$ ,  $124.0 \pm 23.4$  και  $386.8 \pm 66.3$  αυθαίρετες μονάδες για τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα (πίνακας 3).

Η συσχέτιση του LIP με όλες τις παραμέτρους του πίνακα 3 ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, καθώς διαπιστώθηκε ότι αυτή ήταν θετική μόνο στην περίπτωση της ηλικίας. Η διαδικασία της συσχέτισης μεταξύ των δυο αυτών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε μέσω του συντελεστή Spearman's, ο οποίος παρουσίαζε τις εξής τιμές  $r = 0.656$  ( $p < 0.0001$ ) για τα κοκκιοκύτταρα,  $r = 0.572$  ( $p < 0.0001$ ) για τα λεμφοκύτταρα και  $r = 0.702$  ( $p < 0.0001$ ) για τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα (εικόνα 41A, 41B και 41Γ, αντίστοιχα). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει μια εξαρτώμενη από την ηλικία αύξηση των επιπέδων του LIP και στους τρεις τύπους κυττάρων, προφανώς ως αποτέλεσμα της μη σωστής λειτουργίας των ρυθμιστικών ομοιοστατικών μηχανισμών σιδήρου. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση για τις αυξημένες οξειδωτικές τροποποιήσεις βασικών κυτταρικών συστατικών που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της γήρανσης [Oliver CN. et al., 1987; Fraga CG. et al., 1990]. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί πως καμία άλλη από τις παραμέτρους του πίνακα 3 δε συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την ηλικία των δοτών.



**Εικόνα 41.** Αύξηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε σχέση με την ηλικία. Λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ( $1.5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) από υγιείς δότες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP. Οι τιμές των επιπέδων του LIP (Δφθορισμός, κάθετος άξονας) συσχετίστηκαν με την ηλικία των δοτών (Έτη, οριζόντιος άξονας). Η συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων υπολογίστηκε μέσω του συντελεστή Spearman's ( $r$ ) για τα κοκκιοκύτταρα (Α), τα λεμφοκύτταρα (Β) και τα μονοκύτταρα (Γ), αντίστοιχα.

### **3.4. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια**

Στο επόμενο βήμα της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της νέας μεθοδολογίας στο κλινικό σύνδρομο της καρδιακής ανεπάρκειας. Το οξειδωτικό στρες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εμπλέκεται στην παθογένεση και την εξέλιξη του συγκεκριμένου συνδρόμου [Giordano FJ. et al., 2005; Eleuteri E. et al., 2009]. Το LIP αποτελεί ένα νέο δείκτη οξειδωτικού στρες, καθώς καταλύει την παραγωγή των δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου που οδηγούν σε οξειδωτικές τροποποιήσεις βασικών κυτταρικών συστατικών.

Προκειμένου λοιπόν να αξιολογηθεί ο ρόλος του LIP στη βαρύτητα της καρδιακής ανεπάρκειας εκτιμήθηκαν τα επίπεδά του σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος 60 ασθενών με χρόνια συστολική καρδιακή ανεπάρκεια οφειλόμενη σε ισχαιμία (42 ασθενείς) ή διατακτική καρδιομυοπάθεια (18 ασθενείς). Η επιλογή του πληθυσμού των λευκοκυττάρων, ως σύστημα μελέτης, βασίστηκε στο γεγονός της ενεργούς συμμετοχής τους στο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην καρδιακή ανεπάρκεια [Ellis GR. et al., 2000; Kong CW. et al., 2001; Ijsselmuiden AJ. et al., 2008]. Επιπλέον, ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων του LIP με διάφορες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 4, ενώ οι εργαστηριακές παράμετροι στον πίνακα 5. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν με βάση το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF) σε δύο ομάδες, την ομάδα με σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας ( $LVEF \leq 30\%$ ,  $n=28$ ) και την ομάδα με μέτρια καρδιακή ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας ( $LVEF > 30\%$ ,  $n=32$ ).

Οι τιμές των περισσότερων παραμέτρων των πινάκων 4 και 5 ήταν συγκρίσιμες μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, παράμετροι που παρουσίασαν μια αξιοσημείωτη διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ( $p \leq 0.10$ ), όπως τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων, του LIP των μονοκυττάρων, η καρδιακή συχνότητα, η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας (Right Ventricular Systolic Pressure, RVSP) και η λειτουργική κατάσταση κατά NYHA (στάδιο I-II έναντι σταδίου III-IV) ελέγχθηκαν περαιτέρω μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης.

**Πίνακας 4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.**

	LVEF≤30% (n=28)	LVEF>30% (n=32)	P value
Μέση ηλικία (Ετη)*	67.6 ± 9.5	66.9 ± 12.7	0.82
Φύλο (Άρρεν)	26 (93%)	28 (88%)	0.67
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m <sup>2</sup> )	25.4 (9.7)	24.7 (5.0)	0.59
Στάδιο NYHA III-IV	14 (50%)	9 (28%)	0.10
Κολπική μαρμαρυγή	12 (43%)	9 (28%)	0.28
Καρδιακή συχνότητα (παλμοί/λεπτό)	70 (17)	73 (11)	0.09
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	120 (20)	130 (22)	0.81
Συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας (mmHg)	42.6 ± 19.6	28.3 ± 15.9	0.01
Ισχαιμική καρδιομυοπάθεια	21 (75%)	21 (65%)	0.57
Διαβήτης	7 (25%)	10 (32%)	0.77
Υπέρταση	16 (57%)	20 (62%)	0.79
<b>Φαρμακευτική αγωγή</b>			
ACE-I/ARBs	25 (89%)	31 (96%)	0.33
B-αναστολείς	25 (89%)	26 (81%)	0.48
Ανταγωνιστές αλδοστερόνης	21 (75%)	18 (56%)	0.17
Στατίνες	19 (67%)	25 (78%)	0.39

\* Μέσος Όρος ± τυπική απόκλιση

ACE-I (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors)= Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης I, ARBs (Angiotensin Receptor Blockers)= Ανταγωνιστές υποδοχέων αγγειοτενσίνης II

Πίνακας 5. Εργαστηριακές παράμετροι των ασθενών.

	LVEF $\leq$ 30% (n=28)	LVEF>30% (n=32)	P value
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl)	13.5 (3.8)	13.2 (3.6)	0.373
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (ανά mm <sup>3</sup> )	7.340 (2.150)	7.400 (1.295)	0.89
Κάθαρση κρεατινίνης (ml/min)	53.4 $\pm$ 24.6	62.1 $\pm$ 29.6	0.26
K <sup>+</sup> (mEq/l)	4.2 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.4	0.23
Na <sup>+</sup> (mEq/l)	136 (3)	138 (3)	0.36
Ουρικό οξύ (mg/dl)	8.5 $\pm$ 2.5	7.6 $\pm$ 2.3	0.21
Υψηλής ευαισθησίας CRP (mg/l)	9.2 (7.8)	8.67 (8.8)	0.43
Φερριτίνη ορού (ng/ml)	112 (143)	140 (102)	0.62
Σίδηρος ορού (μg/dl)	68 $\pm$ 41	76 $\pm$ 32	0.42
Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα τρανσφερρίνης (TIBC) (μg/dl)	311 $\pm$ 87	315 $\pm$ 46	0.83
<b>Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (LIP) (αυθαίρετες μονάδες)</b>			
<i>Κοκκιοκύτταρα</i>	16.21 (4.92)	14.12 (3.31)	0.01
<i>Μονοκύτταρα</i>	26.03 (5.99)	23.01 (5.91)	0.05
<i>Λεμφοκύτταρα</i>	10.63 (3.17)	9.95 (2.00)	0.22

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης, μόνο τα επίπεδα του LIP του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων (OR: 0.73; 95% CI:0.55-0.98; p=0.039) και η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας (RVSP) (OR: 0.95; 95% CI:0.92-0.99; p=0.027) συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας ανεξαρτήτως των υπόλοιπων παραγόντων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση του κλάσματος εξώθησης αριστερής κοιλίας με τις παραμέτρους των πινάκων 4 και 5 μέσω του συντελεστή

Spearman's (τιμή  $r$ ). Συγκεκριμένα, το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας παρουσίασε σημαντική αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του LIP του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.002$ ), του LIP του πληθυσμού των μονοκυττάρων ( $r = -0.35$ ,  $p = 0.007$ ) και με τη συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας ( $r = -0.43$ ,  $p = 0.003$ ). Το γεγονός αυτό ενδέχεται να σχετίζεται με το μειωμένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην ήπια καρδιακή ανεπάρκεια η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλο κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι δε βρέθηκε συσχέτιση του κλάσματος εξώθησης με φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως είναι ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, η CRP και το ουρικό οξύ.

Τέλος, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν με βάση τα κριτήρια της Καρδιολογικής Εταιρίας της Νέας Υόρκης (New York Heart Association, NYHA) σε δύο επιπλέον ομάδες, την ομάδα με στάδιο NYHA I-II ( $n=34$ ) και την ομάδα με στάδιο NYHA III-IV ( $n=26$ ). Από τη σύγκριση των δύο ομάδων προέκυψε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των επιπέδων του LIP για τα κοκκιοκύτταρα (13.69 αυθαίρετες μονάδες σε σχέση με 15.40 αυθαίρετες μονάδες,  $p=0.03$ ), στην κάθαρση της κρεατινίνης (65ml/λεπτό σε σχέση με 42ml/λεπτό,  $p=0.04$ ), στη συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας ( $26.8 \pm 15.1$ mmHg σε σχέση με  $46.1 \pm 18.6$ mmHg,  $p=0.003$ ), στο κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας ( $p=0.002$ ) και οριακά μια σημαντική διαφορά στα επίπεδα του ουρικού οξέος ( $7.1 \pm 2.5$ mg/dl σε σχέση με  $8.9 \pm 1.9$ mg/dl,  $p=0.054$ ). Ωστόσο, σύμφωνα με την πολυπαραγοντική ανάλυση των προηγούμενων παραγόντων, μόνο η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας συσχετιζόταν ανεξάρτητα με το στάδιο NYHA (OR: 1.07; 95% CI:1.01-1.12;  $p=0.015$ ).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου από εξειδικευμένες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις

Η ανάπτυξη της AXN, όπως είναι ήδη γνωστό, σχετίζεται με διαταραχές της ομοιοστασίας του σιδήρου. Συγκεκριμένα, τα αυξημένα επίπεδα ηπατιδίνης που παρατηρούνται στον ορό του αίματος ασθενών με AXN συμβάλλουν αρχικά στη μείωση των επιπέδων της φερροπορτίνης στις πλασματικές μεμβράνες των μακροφάγων, των εντεροκυττάρων και των ηπατοκυττάρων και ακολούθως στη συσσώρευση του σιδήρου στα κύτταρα αυτά με αποτέλεσμα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες να περιορίζεται η διαθεσιμότητα του σιδήρου για τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Κατά συνέπεια, οι AXN, παρά την ύπαρξη επαρκών ποσοτήτων σιδήρου στον οργανισμό, χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα σιδήρου στον ορό, χαμηλό κορεσμό τρανσφερίνης και μειωμένο αριθμό ερυθροκυττάρων στον ορό του αίματος. Βασική θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση των AXN συνιστά η χορήγηση σκευασμάτων διέγερσης της ερυθροποίησης σε συνδυασμό με την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου όπου αυτή κρίνεται απαραίτητη. Εντούτοις, η θεραπευτική αυτή προσέγγιση συχνά παρουσιάζει τοξικές για τον οργανισμό επιπτώσεις, οι οποίες είναι πιθανόν ότι οφείλονται στην περίσσεια του χορηγούμενου σιδήρου, καθώς είναι γνωστό ότι ο σίδηρος αποτελεί ένα σημαντικό διαμεσολαβητή τοξικότητας σε συνθήκες οξειδωτικού στρες [Salivan, 2007; Galaris and Pantopoulos, 2008; Galaris et al., 2008]. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η δυνατότητα κινητοποίησης του «εγκλωβισμένου» ενδοκυττάριου σιδήρου ως μια εναλλακτική πρόταση για την καλύτερη αντιμετώπιση των AXN.

Σε ένα πρώτο βήμα, αξιολογήθηκε η ικανότητα τριών φαρμακευτικών ενώσεων (δεσφεριοξαμίνη, δεφεριπρόνη και δεφερασιρόξη) και μιας ένωσης φυτικής προέλευσης (καφεϊκό οξύ) να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Ο προσδιορισμός της δέσμευσης του LIP



πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της καλσεΐνης [Epsztejn et al., 1997]. Διαπιστώθηκε ότι οι ενώσεις δεφεριπρόνη και δεφερασιρόξη είχαν την ικανότητα να διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου και να δεσμεύουν το LIP με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης. Αντίθετα, στην περίπτωση της δεσφεριοξαμίνης και του καφεϊκού οξέος, αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της μέτρησης. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με τον τρόπο εισόδου των ενώσεων αυτών στα κύτταρα παρά με την ικανότητά τους να δεσμεύουν σίδηρο, καθώς είναι γνωστό ότι οι ενώσεις αυτές είναι σιδηροδεσμευτικές. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας, η δεσφεριοξαμίνη εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης υγρής φάσης που απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της μέτρησης του φθορισμού της καλσεΐνης [Doulias et al., 2003]. Η παρατήρηση αυτή δύναται να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση και για την περίπτωση του καφεϊκού οξέος. Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν μελετηθεί στο εργαστήριό μας περιπτώσεις ενώσεων φυτικής προέλευσης (λουτεολίνη, φισετίνη, κερκετίνη, μυρικετίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη) που σε αντίθεση με το καφεϊκό οξύ έχουν την ικανότητα να διαχέονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο.

Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι η δέσμευση του ενδοκυττάρου σιδήρου λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας ενάντια στη βλάβη του DNA που προκαλείται από το  $H_2O_2$  [Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003]. Για το λόγο αυτό, σε ένα επόμενο στάδιο, η έρευνά μας κατευθύνθηκε στην αξιολόγηση της ικανότητας των προηγούμενων ενώσεων να προστατεύουν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε  $H_2O_2$ . Από τη μελέτη αυτή προέκυψε το συμπέρασμα ότι η δεφεριπρόνη και η δεφερασιρόξη που είχαν την ικανότητα να διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου προσέφεραν αξιόλογη προστασία, σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, στο κυτταρικό DNA. Αντίθετα, η δεσφεριοξαμίνη και το καφεϊκό οξύ στο υπό μελέτη σύστημα δεν προσέφεραν προστασία στο κυτταρικό DNA ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το  $H_2O_2$  πιθανώς λόγω του διαφορετικού τρόπου εισόδου τους στα κύτταρα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως να αποδίδουν το σίδηρο στην τρανσφερίνη με σκοπό την περαιτέρω αναδιανομή του. Η ικανότητα αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης της τρανσφερίνης σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η τρανσφερίνη είχε την ικανότητα να προσλαμβάνει το

σίδηρο των συμπλόκων σιδήρου:δεφεριπρόνης, σιδήρου:δεφερασιρόξης και σιδήρου:καφεϊκού οξέος, σε αντίθεση με το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεσφριοξαμίνης. Ωστόσο, η ικανότητα αυτή φαίνεται να εξαρτάται από την αναλογία στην οποία βρίσκονται ο σίδηρος με την αντίστοιχη ένωση. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της δεφεριπρόνης όσο αυξάνει η ποσότητα της δεφεριπρόνης σε σχέση με το σίδηρο τόσο η μεταφορά αποσπά με δυσκολία το σίδηρο από το σύμπλοκο, ενώ αντίθετα στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος όσο αυξάνει η συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος σε σχέση με το σίδηρο τόσο αυξάνεται και η ικανότητα της μεταφοράς να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου. Οι παρατηρήσεις αυτές φαίνεται να σχετίζονται με φαινόμενα στερικής παρεμπόδισης. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη για τη διερεύνηση του ακριβούς τρόπου αλληλεπίδρασης των ενώσεων αυτών με την μεταφορά.

Ακολούθως, αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφριοξαμίνης προστέθηκαν στο σύμπλοκο σιδήρου:δεφεριπρόνης, δεδομένου του συχνού συνδυασμού των δύο αυτών φαρμακευτικών σκευασμάτων στην κλινική πράξη. Παρατηρήθηκε ότι η ικανότητα της μεταφοράς να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου μειώθηκε παρουσία των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της δεσφριοξαμίνης. Η διαπίστωση αυτή καταδεικνύει την πρόσληψη του σιδήρου από το μόριο της δεσφριοξαμίνης και όχι από την μεταφορά. Κατά συνέπεια, στην περίπτωση των AXN το γεγονός αυτό θα οδηγούσε στην απομάκρυνση του σιδήρου από τον οργανισμό μέσω της δεσφριοξαμίνης, η οποία αποβάλλεται με τα ούρα, και όχι στην περαιτέρω αναδιανομή του στις ερυθροβλάστες μέσω της μεταφοράς. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στην περίπτωση της προσθήκης δεσφριοξαμίνης στο σύμπλοκο σιδήρου:καφεϊκού οξέος.

Για την καλύτερη κατανόηση της *in vivo* δράσης των ανώτερων φαρμακευτικών σκευασμάτων, πραγματοποιήθηκαν τα ίδια πειράματα στον ορό του αίματος. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, η μεταφορά ορού αποδείχθηκε ότι είχε την ικανότητα να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης ανεξάρτητα από την αναλογία του. Κατ' επέκταση, είναι πιθανόν ότι υπάρχουν διάφοροι παράγοντες στον ορό του αίματος που επιδρούν στην ικανότητα της μεταφοράς να προσλαμβάνει το σίδηρο που είναι δεσμευμένος στη δεφεριπρόνη. Εντούτοις, η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφριοξαμίνης στο σύμπλοκο σιδήρου:δεφεριπρόνης οδήγησε στη μείωση της ικανότητας της μεταφοράς ορού να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αν και πραγματοποιήθηκαν αρκετές προσπάθειες, δεν κατέστη εφικτή η ταυτόχρονη παρατήρηση των διαδοχικών βημάτων για την κινητοποίηση του ενδοκυττάριου σιδήρου από το εσωτερικό των κυττάρων προς την τρανσφερρίνη του εξωκυττάριου χώρου σε ένα ενιαίο πειραματικό μοντέλο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δίνουν το έναυσμα για την εφαρμογή της μελέτης σε γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές φαγοκυττάρων και ηπατοκυττάρων, οι οποίες είτε θα υπερεκφράζουν το γονίδιο της ηπατιδίνης είτε θα παρουσιάζουν αναστολή της έκφρασης του γονιδίου της φερροπορτίνης σε επίπεδο RNA (siRNA). Και στις δύο περιπτώσεις η τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της εξόδου του σιδήρου από τα κύτταρα κατ' αναλογία με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ανάπτυξη της AXN.

#### **4.2. Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε κύτταρα του περιφερικού αίματος**

Επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν τη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [Wood, 2004; Qayyum R. and Schulman P., 2005; You and Wang, 2005; Coyne D., 2006]. Έχει προταθεί πως η αντιφατικότητα αυτή οφείλεται σε μεθοδολογικά προβλήματα που υπάρχουν στην εκτίμηση των επιπέδων του σιδήρου στον οργανισμό [Lee and Jacobs, 2004]. Στους δείκτες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πράξη για την εκτίμηση των επιπέδων του σιδήρου στον οργανισμό συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων η μέτρηση της φερριτίνης και του σιδήρου του ορού του αίματος, της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας πλάσματος (TIBC) και του κορεσμού της τρανσφερρίνης. Ωστόσο, οι δείκτες αυτοί δεν αντιπροσωπεύουν την οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του σιδήρου που είναι ικανή, κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, να οδηγήσει σε βλαπτικές επιπτώσεις για τα κύτταρα και κατ' επέκταση για τον οργανισμό. Εύλογα λοιπόν, προκύπτει το συμπέρασμα πως η ύπαρξη ενός δείκτη που να αντιπροσωπεύει την οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του σιδήρου θα μπορούσε να αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τις μελέτες που διερευνούν το ρόλο του σιδήρου στην παθοφυσιολογία παθολογικών καταστάσεων. Πράγματι, στο παρελθόν έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για την

εκτίμηση της ύπαρξης οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου στον ορό του αίματος (non-transferrin bound iron). Εντούτοις, σύμφωνα με τις συγκεκριμένες μελέτες η ανίχνευση των ιόντων αυτών καθίσταται εφικτή μόνο σε περιπτώσεις ακραίας υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο όπου η τρανσφερρίνη ορού είναι περισσότερο από 80% κορεσμένη [Esposito et al., 2003; Jacobs et al., 2005; Kartikasari et al., 2006; Yongmin et al., 2006]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου στον ορό του αίματος υπό φυσιολογικές συνθήκες, αν υπάρχουν, είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιούνται [Pootrakul et al., 2006].

Σε αντίθεση με τον ορό του αίματος, η ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του σιδήρου, που καλείται LIP, έχει δειχθεί, τουλάχιστον σε κυτταρικές καλλιέργειες, ότι είναι ανιχνεύσιμη και αποτελεί μια πηγή άμεσα διαθέσιμου σιδήρου για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο. Με βάση τα προηγούμενα, καθίσταται εμφανές ότι τα επίπεδα του LIP δύνανται να αποτελέσουν έναν κατάλληλο δείκτη για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του σιδήρου με παθολογικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια νέα μεθοδολογία για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε πληθυσμούς κυττάρων του περιφερικού αίματος ανθρώπου (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα) η οποία στηρίζεται στη σύγχρονη τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής και στη χρήση της φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνη. Η νέα μεθοδολογία είναι απλή, με δυνατότητα επαναληψιμότητας και εφαρμογής τόσο σε περιπτώσεις υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο όσο και σε περιπτώσεις ανεπάρκειας σιδήρου, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει είτε αυξημένα είτε μειωμένα επίπεδα LIP. Ωστόσο, δεν παρέχει τη δυνατότητα της ακριβούς μέτρησης της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου σιδήρου καθώς δεν είναι εφικτή η συσχέτιση των αυθαίρετων μονάδων φθορισμού που προκύπτουν από τον κυτταρομετρητή ροής με την πραγματική συγκέντρωση σιδήρου. Επιπλέον, σύμφωνα με εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας έχει δειχθεί ότι ο ενδοκυττάριος σίδηρος δεν είναι ομοιογενώς κατανομημένος στα διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου και ότι η καλσεΐνη δεν έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει το LIP σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα καθώς η δράση της εξαρτάται από το pH αυτών [Tenopoulou et al., 2005; 2007]. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα του LIP που εκτιμώνται με τη συγκεκριμένη

μέθοδο αντιπροσωπεύουν κυρίως τον ενδοκυττάριο σίδηρο που δεσμεύει η καλσεΐνη στο κυτταρόπλασμα.

Στην παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων, μετά τη λύση των ερυθροκυττάρων, διαχωρίστηκε με κυτταρομετρία ροής με βάση τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό των κυττάρων σε τρεις διακριτούς υποπληθυσμούς (κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσίαζε τα υψηλότερα επίπεδα LIP, των λεμφοκυττάρων τα μικρότερα ενώ των κοκκιοκυττάρων ενδιάμεσα [Doulias et al., 2008]. Η διαφορά αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται τόσο με το διαφορετικό μέγεθος των συγκεκριμένων κυττάρων όσο και με την εντονότερη φαγοκυτταρική ικανότητα που παρατηρείται στον πληθυσμό των μονοκυττάρων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του LIP και στους τρεις πληθυσμούς κυττάρων διατηρήθηκαν σχετικά σταθερά κατά τη μέτρησή τους σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον ενεργό ρόλο των μηχανισμών ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου σε κυτταρικό και συστηματικό επίπεδο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο πληθυσμός των ερυθροκυττάρων στον οποίο παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του LIP ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με εκείνα των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων. Η παρατήρηση αυτή είναι πιθανόν ότι σχετίζεται με το μικρότερο μέγεθος των ερυθροκυττάρων και την απουσία επιμέρους οργανιδίων στο εσωτερικό αυτών. Παράλληλα, η μελέτη επεκτάθηκε και στην εκτίμηση των επιπέδων του LIP στον πληθυσμό των δικτυοερυθροκυττάρων. Τα δικτυοερυθροκύτταρα αποτελούν πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων και για το λόγο αυτό η εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε αυτά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς επιτρέπει την έγκαιρη αξιολόγηση των διαθέσιμων επιπέδων σιδήρου για τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Τα επίπεδα του LIP που καταγράφηκαν για τον πληθυσμό αυτό ήταν υψηλότερα σε σχέση με εκείνα του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό καταδεικνύει τη σταδιακή μείωση του LIP κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων και συμφωνεί με πειραματικά δεδομένα προηγούμενων μελετών της βιβλιογραφίας [Prus E. and Fibach E., 2008].

### 4.3. Ο ρόλος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στη γήρανση

Η γήρανση αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαδικασία που ελέγχεται από ένα περίπλοκο σύστημα μοριακών μηχανισμών. Ανάμεσα στην πληθώρα των υποθέσεων που υπάρχουν για τη διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης, η καλύτερα μελετημένη είναι «η υπόθεση του οξειδωτικού στρες ή των ελεύθερων ριζών» που προτάθηκε από το Harman [Harman, 1956] το 1956 και αργότερα υπεβλήθη σε διάφορες τροποποιήσεις. Με την πάροδο του χρόνου, έχει συγκεντρωθεί ένας εντυπωσιακός όγκος πληροφοριών που υποστηρίζουν τη θεωρία αυτή. Σε πολλά μοντέλα γήρανσης έχει παρατηρηθεί προοδευτική αύξηση του οξειδωτικού στρες και εξασθένηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών [Beckman and Ames, 1998; Brunk and Terman, 2002; Junqueira et al., 2005]. Το γεγονός αυτό οδηγεί αναπόφευκτα στην προοδευτική συσσώρευση οξειδωμένων κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων [Grune et al., 2004; Terman and Brunk, 2006]. Εντούτοις, η παραδοχή πως η αυξημένη κατανάλωση αντιοξειδωτικών θα μπορούσε να επιβραδύνει τη διαδικασία της γήρανσης εκκαθαρίζοντας τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τις οξειδώσεις των κυτταρικών συστατικών δεν έλαβε ποτέ ουσιώδη πειραματική υποστήριξη. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι εξαιρετικά δραστικές ρίζες που δημιουργούνται ενδοκυττάρια δεν είναι δυνατό να εκκαθαριστούν από οποιοδήποτε συστατικό που προστίθεται εξωγενώς λόγω του συναγωνισμού που υπάρχει με άλλους ενδοκυττάριους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι ο ρυθμός με τον οποίο σχηματίζονται οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να μειωθεί δραματικά με τον περιορισμό της διαθεσιμότητας του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου [Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Schoneich, 2006].

Στην παρούσα μελέτη, η θετική συσχέτιση που διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ανάμεσα στα επίπεδα του LIP λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος υγιών δοτών και της ηλικίας αυτών υποδηλώνει μια εξαρτώμενη από την ηλικία αύξηση των επιπέδων του LIP και αντικατοπτρίζει τον ενεργό ρόλο του σιδήρου στις αυξημένες οξειδωτικές τροποποιήσεις βασικών κυτταρικών συστατικών που πραγματοποιούνται κατά τη γήρανση [Doulias et al., 2008]. Για το λόγο αυτό, η ρύθμιση των επιπέδων του LIP θα μπορούσε να επηρεάσει τη διαδικασία της γήρανσης [Polla et al., 2003; Sullivan, 2004]. Η ακριβής αιτία για την αύξηση των επιπέδων του LIP κατά τη

διάρκεια της γήρανσης παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, η πιο πιθανή εξήγηση φαίνεται να είναι η μη σωστή λειτουργία των ομοιοστατικών μηχανισμών σιδήρου.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ο Gackowski και οι συνεργάτες του [Gackowski et al., 2002] έδειξαν πρόσφατα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του LIP των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και της ηλικίας των δοτών. Η ασυμφωνία αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς στη συγκεκριμένη μελέτη ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων απομονώθηκε από τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς του περιφερικού αίματος με χρονοεξαρτώμενες και άλλες περίπλοκες διαδικασίες οι οποίες προφανώς επηρέασαν τα επίπεδα του LIP. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται και από τις υψηλές τιμές των τυπικών αποκλίσεων που καταγράφηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη σε σύγκριση με τις χαμηλότερες τιμές των τυπικών αποκλίσεων της παρούσας μελέτης όπου ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων μελετήθηκε μετά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

#### **4.4. Ο ρόλος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στη Χρόνια Καρδιακή Ανεπάρκεια**

Ένας σημαντικός αριθμός καλά εμπεριστατωμένων μελετών υποστηρίζει τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην παθοφυσιολογία και την εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, διεργασίες, που εμπλέκονται στην καρδιακή ανεπάρκεια, όπως η απόπτωση και η νέκρωση των μυοκαρδιακών κυττάρων, η κοιλιακή αναδιαμόρφωση της καρδιάς (ventricular remodeling), ο ηλεκτρομηχανικός διαχωρισμός της καρδιάς (mechanoelectric uncoupling) και η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, επάγονται από το οξειδωτικό στρες [Korantzopoulos et al., 2003; Giordano, 2005; Eleuteri et al., 2009]. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η φλεγμονή και η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύουν την ένταση του οξειδωτικού στρες και πιθανώς της καρδιακής ανεπάρκειας [Braunwald, 2008; Celis et al., 2008; Eleuteri et al., 2009]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες στον πληθυσμό των λευκοκυττάρων ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια είναι αυξημένο συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην παρατηρούμενη οξειδωτική καταστροφή [Ellis et al., 2000; Kong et al., 2001; Ijsselmuiden et al., 2008]. Ειδικότερα, η ικανότητα των ουδετερόφιλων να παράγουν δραστικές μορφές

οξυγόνου μέσω της δράσης της NADPH οξειδάσης φαίνεται να ενισχύεται σε ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [Ellis et al., 2000]. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι δείκτες που χρησιμοποιούνται έως σήμερα για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες στον ορό και τα ούρα αντιπροσωπεύουν έμμεσους δείκτες της οξειδωτικής καταστροφής και δε συνεισφέρουν στην κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας των δραστικών μορφών οξυγόνου. Από την άλλη πλευρά, ένας νέος άμεσος δείκτης οξειδωτικού στρες είναι το LIP που καταλύει την αντίδραση Fenton με αποτέλεσμα το σχηματισμό των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου οι οποίες μεταξύ άλλων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων [Ide et al., 2000; Kell, 2009]. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η τοξικότητα που παρουσιάζει το LIP διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη νεφρική βλάβη μετά από επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (bypass) [Haase et al., 2010].

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η πιθανή συμμετοχή του LIP στην εξέλιξη και τη βαρύτητα του συνδρόμου της καρδιακής ανεπάρκειας. Για το λόγο αυτό, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα του LIP σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας. Διαπιστώθηκε ότι μόνο τα επίπεδα του LIP του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων και η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας (RVSP) συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας (LVEF $\leq$ 30%) ανεξαρτήτως των υπόλοιπων παραγόντων, παρά το γεγονός ότι στη μελέτη συμπεριλήφθησαν διάφορες κλινικές και εργαστηριακές παράμετροι που αποτελούν συμβατικούς δείκτες φλεγμονής όπως η υψηλής ευαισθησίας μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και το ουρικό οξύ. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (LVEF) και των επιπέδων του LIP των πληθυσμών των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως σε περιπτώσεις σοβαρής καρδιακής ανεπάρκειας με χαμηλό κλάσμα εξώθησης τα επίπεδα του LIP και κατά συνέπεια του οξειδωτικού στρες είναι αυξημένα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας αντιπροσωπεύει έναν αντικειμενικό δείκτη της βαρύτητας της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας. Ωστόσο, η βαρύτητα της καρδιακής ανεπάρκειας



μπορεί ακόμη να αξιολογηθεί με βάση τα συμπτώματα και την ανοχή των ασθενών στην άσκηση σύμφωνα με τη λειτουργική ταξινόμηση κατά NYHA. Προηγούμενες μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στη διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες στη βαρύτητα της καρδιακής ανεπάρκειας με βάση τη λειτουργική ταξινόμηση κατά NYHA [Keith et al., 1998; Hokamaki et al., 2004; Tang et al., 2006; Radovanovic et al., 2008; Nagayoshi et al., 2009]. Για το λόγο αυτό, σε ένα επόμενο βήμα της παρούσας μελέτης ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του LIP και τη βαρύτητα της καρδιακής ανεπάρκειας με βάση τη λειτουργική ταξινόμηση κατά NYHA. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του LIP του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων ήταν αυξημένα σε ασθενείς σταδίου III-IV κατά NYHA. Εντούτοις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης προέκυψε ότι η συσχέτιση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Συνοψίζοντας τα προηγούμενα προκύπτει το συμπέρασμα ότι το LIP, ως ένας νέος άμεσος δείκτης του οξειδωτικού στρες, για πρώτη φορά συσχετίζεται με τη βαρύτητα της καρδιακής ανεπάρκειας. Ωστόσο, χρήζει περαιτέρω έρευνας η εφαρμογή του ως προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη ήταν τα εξής:

### *Μέρος Α*

A) Η δεφεριπρόνη και η δεφερασιρόξη παρέχουν προστασία του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες μέσω της δέσμευσης του ενδοκυττάριου σιδήρου.

B) Η δεσφериοξαμίνη και το καφεϊκό οξύ στο υπό μελέτη σύστημα δε δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο.

Γ) Η τρανσφερρίνη έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει το σίδηρο των συμπλόκων σιδήρου:δεφεριπρόνης, σιδήρου:δεφερασιρόξης και σιδήρου καφεϊκού οξέος.

Δ) Η ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης και σιδήρου:καφεϊκού οξέος μειώνεται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφериοξαμίνης.

E) Η τρανσφερρίνη ορού έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει το σίδηρο των συμπλόκων σιδήρου:δεφεριπρόνης.

Θ) Η ικανότητα της τρανσφερρίνης ορού να προσλαμβάνει το σίδηρο του συμπλόκου σιδήρου:δεφεριπρόνης μειώνεται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφериοξαμίνης.

*Μέρος Β*

Α) Ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα LIP, των λεμφοκυττάρων τα μικρότερα, ενώ των κοκκιοκυττάρων ενδιάμεσα.

Β) Για τον κάθε δότη, τα επίπεδα του LIP στον πληθυσμό των κοκκιοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων διατηρούνται σχετικά σταθερά μεταξύ δύο διαφορετικών χρονικών σημείων.

Γ) Ο πληθυσμός των ερυθροκυττάρων παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα LIP σε σύγκριση με εκείνα των λευκοκυττάρων.

Δ) Ο πληθυσμός των δικτυοερυθροκυττάρων παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα LIP σε σύγκριση με εκείνα των ερυθροκυττάρων.

*Μέρος Γ*

Α) Σε υγιείς δότες, η ηλικία συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων ( $r= 0.656$ ,  $p<0.0001$ ), των μονοκυττάρων ( $r= 0.702$ ,  $p<0.0001$ ) και των λεμφοκυττάρων ( $r= 0.572$ ,  $p<0.0001$ ), υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του σιδήρου στη διαδικασία της γήρανσης.

Β) Σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων και η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας συσχετίζονται με τη βαρύτητα της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας ανεξαρτήτως άλλων παραγόντων.

Γ) Σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων ( $r= -0.39$ ,  $p=0.002$ ), του LIP των μονοκυττάρων ( $r= -0.35$ ,  $p=0.007$ ) και με τη συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας ( $r= -0.43$ ,  $p=0.003$ ).

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **Διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και της ομοιοστασίας του σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις**

Ο σίδηρος, λόγω της ικανότητάς του να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση προσλαμβάνοντας ή αποδίδοντας ηλεκτρόνια, φαίνεται ότι έχει επιλεγεί από τη φύση κατά τη διαδικασία της εξέλιξης για τη διεκπεραίωση μιας σειράς βασικών λειτουργιών που χαρακτηρίζουν τη ζωή. Ταυτόχρονα όμως, η ίδια ικανότητα τον καθιστά έναν ιδιαίτερα επικίνδυνο παράγοντα καθώς του επιτρέπει να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών. Για το λόγο αυτό, οι οργανισμοί και ειδικότερα ο άνθρωπος διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο για τη δέσμευση του σιδήρου και την ασφαλή αποθήκευσή του. Ωστόσο, μια μικρή ποσότητα σιδήρου παραμένει «ελεύθερη» στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι οξειδοαναγωγικά ενεργή (Labile Iron Pool, LIP) καθώς έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Fenton με δυσάρεστες για το κύτταρο επιπτώσεις.

Η άποψη, ότι ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες εμπλέκονται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, οδήγησε στη διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και της ομοιοστασίας του σιδήρου στις καταστάσεις αυτές. Δεδομένης της συσσώρευσης του σιδήρου που παρατηρείται στις αναιμίες χρόνιας νόσου, τέσσερις ενώσεις, η δεσφεριοξαμίνη, η δεφεριπρόνη, η δεφερασιρόξη και το καφεϊκό οξύ, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να κινητοποιούν τον «εγκλωβισμένο» ενδοκυττάριο σίδηρο. Διαπιστώθηκε πως η δεφεριπρόνη και η δεφερασιρόξη είχαν την ικανότητα να διαχέονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο παρέχοντας με τον τρόπο αυτό προστασία του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Σε αντίθεση, η δεσφεριοξαμίνη και το καφεϊκό οξύ στο υπό μελέτη σύστημα δεν είχαν την ικανότητα να δεσμεύσουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο και να προσφέρουν προστασία στο κυτταρικό DNA. Το γεγονός αυτό αντανακλά το διαφορετικό τρόπο εισόδου της

δεσφериοξαμίνης και του καφεϊκού οξέος στα κύτταρα, καθώς είναι γνωστό ότι οι ενώσεις αυτές είναι σιδηροδεσμευτικές. Όσον αφορά την απόδοση του σιδήρου από τις ενώσεις αυτές στην τρανσφερρίνη, για την περαιτέρω αναδιανομή του, παρατηρήθηκε ότι η δεφεριπρόνη, η δεφερασιρόξη και το καφεϊκό οξύ είχαν την ικανότητα να αποδίδουν το σίδηρο στην τρανσφερρίνη, ενώ η δεσφериοξαμίνη δεν παρουσίασε την ικανότητα αυτή. Αντίθετα, η παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων δεσφериοξαμίνης είχε αρνητική επίδραση στην ικανότητα της τρανσφερρίνης να προσλαμβάνει το σίδηρο από τις προηγούμενες ενώσεις.

Στη συνέχεια, η μελέτη επεκτάθηκε στην ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε κύτταρα του περιφερικού αίματος ανθρώπου (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα). Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσίαζε τα υψηλότερα επίπεδα LIP, των λεμφοκυττάρων τα μικρότερα, ενώ των κοκκιοκυττάρων ενδιάμεσα. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του LIP και για τους τρεις τύπους λευκοκυττάρων διατηρούνται σχετικά σταθερά μεταξύ δύο διαφορετικών χρονικών σημείων για τον κάθε δότη. Όσον αφορά τον πληθυσμό των ερυθροκυττάρων, τα επίπεδα του LIP σε αυτόν ήταν χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα των λευκοκυττάρων. Για τα δικτυοερυθροκύτταρα, που αποτελούν πρόδρομη μορφή των ερυθροκυττάρων, τα επίπεδα του LIP ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα των ερυθροκυττάρων.

Τέλος, διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της νέας αυτής μεθοδολογίας στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και τη γήρανση με στόχο την αξιολόγηση του ρόλου του LIP σε αυτές τις καταστάσεις. Στην περίπτωση της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων και η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας των ασθενών συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της συστολικής ανεπάρκειας αριστερής κοιλίας ανεξαρτήτως άλλων παραγόντων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του LIP των κοκκιοκυττάρων ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.002$ ), του LIP των μονοκυττάρων ( $r = -0.35$ ,  $p = 0.007$ ) και με τη συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας ( $r = -0.43$ ,  $p = 0.003$ ). Στην περίπτωση της γήρανσης, προέκυψε μια θετική συσχέτιση των επιπέδων του LIP των κοκκιοκυττάρων ( $r = 0.656$ ,  $p < 0.0001$ ), των μονοκυττάρων ( $r = 0.702$ ,  $p < 0.0001$ ) και των λεμφοκυττάρων ( $r = 0.572$ ,  $p < 0.0001$ ) με την ηλικία.

Συνοψίζοντας τα προηγούμενα προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος φαίνεται να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία των

παραπάνω παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες, ώστε να καταστεί εφικτή η ευρεία εφαρμογή του ως δείκτη οξειδωτικού στρες σε κλινικό επίπεδο.

## 6. SUMMARY

### **The role of oxidative stress and iron homeostasis in pathological conditions**

The ability of iron to be in various oxidation states makes it an essential element in many fundamental cellular processes associated with basic physiological cell functions such as oxygen sensing and transport, electron transfer, DNA and protein synthesis and the metabolism of xenobiotics. Simultaneously, the same high redox potential that enables iron to readily switch between the ferrous and ferric states also makes it extremely toxic. Thus, it is not surprising that nature handles iron with the highest care and iron homeostasis is carefully regulated at systemic, tissue and cellular level by sophisticated mechanisms in order to avoid such injurious interactions. Although iron is usually bound on high affinity to specialized proteins, which abrogate the deleterious effects of free iron during oxidative stress, a distinct minor fraction of total cellular iron is thought to be loosely bound to diverse intracellular ligands and serves as a crossroad of cell iron metabolism. This fraction of iron is called labile iron pool (LIP) or redox-active iron and in the presence of  $H_2O_2$ , it catalyzes the generation of the extremely reactive hydroxyl radical ( $HO^\bullet$ ) via the Fenton Reaction.

Oxidative stress and LIP are believed to be involved in numerous pathological conditions, but the exact molecular mechanisms underlying this involvement remain obscure. The present study represents an effort to investigate the role of oxidative stress and iron homeostasis in some pathological conditions. Considering the accumulation of iron observed in anaemia of chronic disease (ACD), we examined three pharmaceutical products (desferrioxamine, deferiprone, deferasirox) and one constituent of mediterranean diet, caffeic acid, for their ability to mobilize the “entrapped” iron. It was shown that deferiprone and deferasirox, contrary to desferrioxamine and caffeic acid, had the capacity to chelate intracellular iron and to protect the cellular DNA against  $H_2O_2$ -induced damage. Following, deferiprone, deferasirox and caffeic acid had the ability to donate iron to transferrin, contrary to

desferrioxamine. However, the presence of increased concentrations of desferrioxamine influences this ability adversely.

In another set of experiments, we exploited the opportunity of using the powerful advantages offered by flow cytometry in order to develop a new methodology for the comparative estimation of LIP levels in populations of cells from freshly collected human blood (leukocytes, erythrocytes and reticulocytes). It was observed that the population of monocytes appears the highest LIP levels, the lymphocytes the less while the granulocytes were in-between. In addition, it was revealed that the LIP levels are finely regulated in healthy individual. In contrast the population of erythrocytes had lower levels of LIP comparably to those of leukocytes. In reverse, the population of reticulocytes had higher LIP levels than erythrocytes.

Finally, based on the above results, an effort was made in order to investigate the role of LIP in chronic cardiac failure and ageing. The multivariate logistic regression analysis showed that only LIP in granulocytes and right ventricular systolic pressure (RVSP) were independently associated with severe left ventricular systolic dysfunction ( $LVEF \leq 30\%$ ). The correlation analysis revealed that the LVEF inversely associated with LIP in granulocytes ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.002$ ), LIP in monocytes ( $r = -0.35$ ,  $p = 0.007$ ), and RVSP ( $r = -0.43$ ,  $p = 0.003$ ). In the case of ageing a strong positive correlation emerged between the levels of LIP and age. The correlation was strong for all types of cells, with  $r = 0.656$ ,  $0.572$  and  $0.702$  for granulocytes, lymphocytes and monocytes, respectively ( $p < 0.0001$ ).

In conclusion, the results of the present research indicate the crucial role of LIP in ageing and age-related diseases as well as in other iron- and oxidative stress-related pathological conditions. However, further research is necessary for the establishment of LIP as an index of oxidative stress with clinical usefulness.



## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abboud S. and Haile DJ. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 275: 19906-19912.

Aisen P, Leibman A, Zweier J. (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.* 253:1930-1937.

Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 33: 940-959.

Amir O, Paz H, Rogowski O, Barshai M. et al. (2009). Serum oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic systolic heart failure patients. *Clin Cardiol.* 32:199-203.

Andrews NC. (1999). Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 34: 1986-1995.

Andrews NC. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112(2): 219-30.

Antunes and Cadenas (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: submicromolar levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med.* 30(9): 1008-18.

Arosio P, and Levi S. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.*

Babbit JL, Huang FW, Wrighting DM. et al. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 38: 351-539

Baker HM, Anderson BF, Baker EN. (2003). Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100(7): 3579-83.

Barbouti A, Doulias PT, Zhu BZ. et al. (2001). Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 31: 490-498.

Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E. et al. (2007). Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med.* 43(10): 1377-87.

Battino M, Ferreiro MS. (2004) Ageing and the Mediterranean diet: a review of the role of dietary fats. *Pub Heal Nutr.* 7: 953-958.

Beard JL, Connor JR, Jones BC. (1993). *Nutr Rev.* 51(6): 157-70. Review.

Beckman KB, Ames BN. (1998). The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev.* 78: 547-581.

Beinert H, Holm RH, Munck E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-659.

Besarab A, Bolton WK, Browne JK. et al. (1998). The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med.* 339:584-590.

Biesalski HK. (2004) Diabetes preventive components in the Mediterranean diet *Eur J Nutr.* 43: 26-30.

Bothwell T, Charlton R, Cook J, and Finch C. (1979). Iron metabolism. *p.* 276. *Blackwell, Oxford, UK.*

Braunwald E. (2008). Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 358:2148-2159.

Breuer W, Shvartsman M and Cabantchik ZI. (2008). Intracellular labile iron. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 40(3): 350-354.

Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ. et al. (2003). Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 361: 669-673.

Brittenham GM. (1991). Disorders of Iron Metabolism. *Chapter 18 in Hematology: Basic Principles and Practice. 2<sup>nd</sup> edition, Churchill-Livingstone.*

Bruick RK. (2003). Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 17: 2614-2623.

Brunk U, terman A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 269 : 1996-2002.

Bruyninckx W, Mason HS, Morse SA. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature* 274: 606-607.

Cabantchik ZI, Kakhlon O, Epsztejn S. et al. (2002). Intracellular and extracellular labile iron pools. *Adv Exp Med Biol.* 509: 55-75.

Calvillo L, Latini R, Kajstura J. et al. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4802-4806.

Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P. et al. (2001). Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mK/mk mice. *Blood* 98: 3823-3830.

Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C. et al. (2006). Comparative studies of duodenal and macrophages ferroportin proteins. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290: G156-G163.

Carpenter CE, Mahoney AW. (1992). Contributions of heme and non-heme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31: 333-367.

Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59: 527-605.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 29: 323-333.

Celis R, Torre-Martinez G, Torre-Amione G. (2008). Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy? *Curr Opin Cardiol.* 23:254-260.

Chen W, Paradkar PN, Li L. et al. (2009). Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 106(38): 16263-8.

Cheng Y, Zak O, Aisen P. et al. (2004). Structure of human transferrin receptor transferrin complex. *Cell* 116: 565-576.

Chevion M, Leibowitz S, Aye NN. et al. (2008). Heart protection by ischemic preconditioning: a novel pathway initiated by iron and mediated by ferritin. *J Mol Cell Cardiol* 45(6): 839-45.

Chua A and Graham RM. (2007). The regulation of cellular iron metabolism. *Crit. Rev Clin Lab Sci.* 44(5-6): 413-59.

Coyne D. (2006). Iron indices: what do they really mean? *Kidney Int Suppl.* 104: S4-8.

Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. (1983). PH and the recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 80:2258-2262.

De Domenico I, Ward DM, di Patti MC. et al. (2007). Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 26: 2823-2831.

De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM. et al. (2008). The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab.* 8(2): 146-156.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y. et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin-1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776-781.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL. et al. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 1: 191-200.

Doulias PT, Christoforidis S, Brunk U and Galaris D. (2003) Endosomal and lysosomal effects of desferioxamine: Protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell cycle arrest. *Free Radic Biol Med.* 35: 719-728.

Doulias PT, Vlachou C, Boudouri C. et al. (2008). Flow cytometric estimation of labile iron pool in human white blood cells reveals a positive association with ageing. *Free Radic Res.* 42(3): 253-9.

Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N. et al. (2006). Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med* 355: 2071-2084.

Eaton JW and Quian M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med.* 32(9): 833-40.

Eggena P, Willsey P, Jamgotchian N. et al. (1991). Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and tissue renin-angiotensin systems. *Am J Physiol.* 261: E642-E646.

Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I. et al. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci.* 14:2230-2237.

Ellis GR, Anderson RA, Lang D. et al. (2000). Neutrophil superoxide anion-generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol* 36: 1474-1482.

Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H. et al. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* 248: 31-40.

Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P. et al. (2003). Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* 102(7): 2670-7.

Ferria C, Grassib G. (2003) Mediterranean diet, cocoa and cardiovascular disease: a sweeter life, a longer life, or both? *J Hypertens.* 21: 2231-2234.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A. et al. (1999). Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol.* 1: 152-157.

Fillebeen C, Caltagirone A, Martelli A. et al. (2005). IRP1 Ser-711 is a phosphorylation site, critical for regulation of RNA-binding and aconitase activities. *Biochem J* 388: 143-150.

Fleming MD, Trenor CC, Su MA. et al. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* 16: 383-386.

Fleming MD, Romano MA, Su MA. et al. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 95: 1148-1153.

Food and Drug Administration, USA. (2007). Information for Healthcare Professionals. Erythropoiesis Stimulating Agents (ESA) [Aranesp (darbepoetin), Epogen (epoetin alfa), and Procrit (epoetin alfa)]. FDA Alert.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW. et al. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87: 4533-4537.

Gackowski D, Kruszewski M, Jawien A. et al. (2001). Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 31(4): 542-7.

Gackowski D, Kruszewsk M, Banaszkiwicz Z. et al. (2002). Lymphocyte labile iron pool, plasma iron, transferrin saturation and ferritin levels in colon cancer patients. *Acta Biochim Pol.* 49(1): 269-72.

Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. (2006). Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des.* 12(23): 2875-90.

Galaris and Pantopoulos (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45(1):1-23.

Galaris D, Mantzaris M, Amorgianiotis C. (2008). Oxidative stress and ageing: the potential role of iron. *Hormones* 7(2): 114-22. Review.

Ganz T. (2003). Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102: 783-788.

Ganz T. (2006). Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Center* 46: 554-557.

Ghali JK, Anand IS, Abraham WT. et al. (2008). Randomized double-blind trial of darbepoetin alfa in patients with symptomatic heart failure and anemia. *Circulation*. 117:526-35.

Giordano FJ. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115:500-8.

Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* 106: 3242-3250.

Greenberg GR and Wintrobe MM. (1946). A labile iron pool. *J Biol Chem*. 165(1): 397.

Gregory A, Hayflick SJ. (2005). Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Folia Neuropathol*. 43(4): 286-96.

Grune T, Jung K, Merker K, Davies KJA. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregation, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid and aggresomes during oxidative stress, aging and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 2519-2530.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV. et al. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488.

Gutteridge JM and Halliwell B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 136-47.

Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. (2010). Novel biomarkers, oxidative stress, and the role of labile iron toxicity in cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol*. 55:2024-2033.

Halliwell B, Cuttidge JC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Clarendon Press, Oxford 500pp.



Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3): 298-300.

Harman D. (1972). The biologic clock: the mitochondria; *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147.

Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H. et al. (1995). Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 92(7): 2539-43.

Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. (1999). Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 96(19): 10812-7.

Hayflick SJ. (2006). Neurodegeneration with brain iron accumulation: from genes to pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol.* 13(3): 182-5.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117(3): 285-97.

Himmelfarb J. (2005). Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin.* 23(3): 319-30.

Hokamaki J, Kawano H, Yoshimura M. et al. (2004). Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 43:1880-1885.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S. et al. (2000). Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res.* 86:152-157.

Ijsselmuiden AJ, Musters RJ, de Ruiter G. et al. (2008). Circulating white blood cells and platelets amplify oxidative stress in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5:811-820.

Jacobs A. (1977). Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood* 50(3): 433-9.

Jacobs EM, Hendricks JC, van Tits BL. et al. (2005). Results of an international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron: need for defining standardization and a clinically relevant isoform. *Anal Biochem* 341: 241-250.

Junqueira VB, Barros SB, Chan SS. et al. (2005). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 25: 5-16.

Johansson HE, Theil EC. (2002). Iron-response element (IRE) structure and combinatorial RNA regulation. In: Templeton, D.M. (Ed.), *Molecular and cellular iron transport*. Marcel Dekker, New York, pp.237-253.

Johnson, EJ. (2002) The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care* 5: 56-65.

Jordan JB., Poppe L., Haniu M. et al. (2009). Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics and structure. *J. Biol. Chem.* 284: 24155-24167.

Kakhlon O and Cabantchik Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med.* 33: 1037-1046.

Kartikasari AE, Georgiou NA, Visseren FL. et al. (2006). Intracellular labile iron modulates adhesion of human monocytes to human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(12): 2257-62.

Kawabata H, Yang R, Hiramata T. et al. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor like family. *J Biol Chem.* 274: 20826-20832.

K/DOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease in adults. (2006). *Am J Kidney Dis* 47[Suppl 3]: S11-S145.

Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ. et al. (1998). Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 31:1352-1356.

Kell DB. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics.* 2:2.

Klausner RD, Harford J, van Renswoude J. (1983). Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 81: 3005-3009.

Knutson M and Wessling-Resnick M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 38: 61-88.

Kok FJ., Kromhout D. (2004). Atherosclerosis. Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr.* 43: 2-5.

Koliaraki V, Marinou M, Samiotaki M. et al. (2008). Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant hepcidin expressed in *Pichia pastoris*. *Biochimie* 90(5): 726-35.

Kong CW, Hsu TG, Lu FJ, et al. (2001). Leukocyte mitochondria depolarization and apoptosis in advanced heart failure: clinical correlations and effect of therapy. *J Am Coll Cardiol.* 38:1693-1700.

Korantzopoulos P, Galaris D, Papaioannides D, Siogas K. (2003). The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med Sci Monit* 9: RA140-145.

Kozlov AV, Yegorov Dy, Vladimirov YA, Azizova OA. (1992). Intracellular free iron in liver tissue and liver homogenate: studies with electron paramagnetic resonance on the formation of paramagnetic complexes with desferal and nitric oxide. *Free radic Biol Med.* 13(1); 9-16.

Krause A, Neitz S, Magert HJ., Schulz A. et al. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480: 147-150.

Kruszewski M. (2004). The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochim Pol.* 52(2): 471-80.

Kurz T, Terman A, Brunk UT. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys.* 462(2): 220-30.

Lee GR. (1983). The anemia in chronic disease. *Semin Hematol* 20: 61-80.

Lee DH, Jacobs DR. Serum markers of stored body iron are not appropriate markers of health effects of iron: a focus on serum ferritin. *Med Hypoth.* 66: 442-445.

Lefer and Granger (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 109(4): 315-23.

Lorgeril M, Salen P. (2000). Diet as preventive medicine in cardiology. *Curr Opin Cardiol.* 15: 364-370.

Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G. (2003). The role of the iron responsive element in the control of ferroportin 1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol.* 39(5): 710-5.

Mackenzie B and Garrick MD. (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289(6): G981-6.

Makey DG, Seal US. (1976). The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim Biophys Acta.* 453(1): 250-6.

Mancini DM, Katz SD, Lang CC. et al. (2003). Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation* 107: 294-299.

Martinez-Gonzalez, MA, Estruch R. (2004). Mediterranean diet, antioxidants and cancer: the need for randomized trials. *Eur J Cancer Prev.* 13: 327-335.

McCord JM, Fridovich I. (1969a). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244: 6049-55.

McCord JM. (2004). Iron, free radicals and oxidative injury. *J Nutr.* 134: 3171S-3172S.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A. et al. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 5: 299-309.

Means RT. (2003). Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep* 2: 116-121.

Mello Filho A, Hoffmann ME, Meneghini R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J.* 218: 273-275.

Mok H, Jelinek J, Pai S. et al. (2004). Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development* 131: 1859-1868.

Muckenthaler MU, Galy B, and Hentze MW. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.* 28: 197-213.

Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y. et al. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 43(4): 477-503.

Muir A, and Hopfer U. (1985). Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush-border membranes from normal and iron-deficient mice. *Am J Physiol.* 248 (3Pt1): G376-G379.

Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J. et al. (2009). Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: comparison of oxidative stress in patients with and without coronary artery disease. *Free Radic Res.* 43:1159-1166.

Nemeth E, Valore EV, Territo M. et al. (2003). Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101(7): 2461-3.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V. et al. (2004). IL 6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 113: 1271-1276.

Nemeth E, Roetto A, Garozzo G. et al. (2005). Heparin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105: 1803-1806.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I. et al. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 98: 8780-8785.

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A. et al. (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 99, 4596-4601.

Nousis L, Doulias PT, Aligiannis et al. (2006). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 39: 787-795.

Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL. et al. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* 37: 1264-1269.

Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108(4): 1388-94.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ. et al. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem.* 262: 5488-5491.

Omiya S, Hikoso s, Imanishi S. et al. (2009). Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 46(1): 59-66.

Ostling O, Johanson KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 123: 291-298.

Palazzuoli A, Silverberg DS, Iovine F. et al. (2007). Effects of beta-erythropoietin treatment on left ventricular remodeling, systolic function, and B-type natriuretic peptide levels in patients with the cardiorenal anemia syndrome. *Am Heart J.* 154:9-15.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Polychronopoulos E. et al. (2004). Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit.* 10: 193-198.

Panayiotidis M, Tsolas O, Galaris D. (1999). Glucose oxidase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med.* 26(5-6): 548-56.

Pantopoulos K. (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci.* 1012: 1-13.

Papanikolaou G, Pantopoulos K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 199-211.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 276: 7806-7810.

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J. et al. (2003). A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest.* 112: 999-1007.

Petrat, F, de Groot H, Sustmann R and Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Che.* 383: 489-502.

Peslova G, Petrak J, Kuzelova K. et al. (2009). Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* 113: 6225-6236.

Pigeon, Ilyin G, Courselaud B. et al. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276(11): 7811-9.

Polla AS, Polla LL, Polla BS. (2003). Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev.* 2: 25-37.

Ponka P. (1997). Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1-25.

Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35: 35-54.

Ponikowski P, Anker SD, Szachniewicz J. et al. (2007). Effect of darbepoetin alfa on exercise tolerance in anemic patients with symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 49: 753-62.

Prus E and Fibach E. (2007). Flow cytometry measurement of the labile iron pool in human hematopoietic cells. *Cytometry Part 73A:* 22-27.

Pootrakul P, Breuer W, Sametband M. et al. (2006). Labile plasma iron as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overload  $\beta$ -thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood* 104: 1504-1510.

Qayyum R, Schulman P. (2005). Iron and atherosclerosis. *Clin Cardiol.* 28: 119-122.



Qiu A, Jansen M, Sakaris A. et al. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917-928

Radovanovic S, Krotin M, Simic DV. et al. (2008). Markers of oxidative damage in chronic heart failure: role in disease progression. *Redox Rep.* 13:109-116.

Rao AV, Rao LG. (2004). Lycopene and human health. *Cur Topics Nutr. Res.* 2: 127-136.

Rattan SI. (2006). Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res.* 40: 1230-1238.

Recalcatti S, Minotti G. and Cairo G. (2010). Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid Redox Signal.* 10.1089/ars.2009.2983.

Richardson DR. (2005). 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age; *Cell* 123: 1175-117.

Rodriguez R, Corwina H, Gettingera A. et al. (2001). Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of the anemia of critical illness. *J Crit Care* 16: 36-41.

Rodrigue ME, Moreau C, Larivière R, Lebel M. (2003). Relationship between eicosanoids and endothelin-1 in the pathogenesis of erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41:388-395.

Roetto A, Papanikolaou G, Politou M. et al. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 33: 21-22.

Roetto A, Daraio F, Porporato P. et al. (2004). Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood* 103(6): 2407-9.

Roy CN, Custodio AO, De Graaf J. et al. (2004). An Hfe-dependent pathway mediates hyposideremia in response to lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *Nat Genet.* 36: 481-485.

Rouault TA. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 8: 406-14.

Schoneich C. (2006). Protein modification in aging: an update. *Exp Gerontol.* 41: 807-812.

Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS. et al. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801.

Shaw GC, Cope JJ, Li L. et al. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440: 96-100.

Sheftel AD, Zhand AS, Brown C. et al. (2007). Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* 110: 125-132.

Sheeran and Pepe (2006). Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim Biophys Acta.* 1757(5-6): 543-552.

Shigenaga M, Hagen T, Ames B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 10771-10778.

Sies and Cadenas (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311(1152):617-31.

Silverberg DS, Wexler D, Blum M. et al. (2000). The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. *J Am Coll Cardiol.* 35:1737-1744.

Silverberg DS, Wexler D, Sheps D. et al. (2001). The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 37:1775-1780.

Singh AK, Szczech L, Tang KL. et al. (2006). Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 355: 2085-2098.

Sohal RS, Weindruch R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.

Stahl W, Sies H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys.* 336: 1-9.

Steele M, Stuchbury G, Münch G. (2006). The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition *Exp Gerontol.* 42: 28-36.

Stipanuk M and Baynes M. (2000). Iron. *Chapter 31: in Biochemical and Physiological aspects of Human Nutrition.*

Su MA, Trenor CC, Fleming MD. et al. (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter nramp2. *Blood* 92: 2157-2163.

Sullivan JL. (2004). Is stored iron safe; *J Lab Clin Med.* 144: 280-284.

Sullivan JL. (2007). Long-term risks of increased use of intravenous iron. *Lancet* 370: 481-482.

Takizawa M, Chiba J, Haga S. et al. (2006). Novel two-parameter flow cytometry allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J Immunol Methods.* 311: 47-56.

Tang WH, Brennan ML, Philip K. et al. (2006). Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 98:796-799.

Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A. et al. (2005). Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J.* 387(Pt3): 703-10.

Tenopoulou M, Kurz T, Doulias P. et al. (2007). Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochem J.* 403(2): 261-6.

Terman A, Brunk U. (2006). Oxidative stress, accumulation of biological “garbage” and aging. *Antiox Redox Signal.* 8: 197-204.

Trachtenberg BH, Hare JM. (2009). Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin* 5:561-577.

Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T. et al. (2005). Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *B M J.* 330: 991-997.

Tsutsui H. (2004). Novel pathophysiological insight and treatment strategies for heart failure--lessons from mice and patients. *Circ J.* 68(12). 1095-103.

Vaisman B, Meyron-Holtz E, Fibach E, Krichevsky A, Konijn A. (2000). Ferritin expression in maturing normal human erythroid precursors. *Br J Haematol* 110: 394-401.

van Iperen CE, Kraaijenhagen RJ, Biesma DH. et al. (1998). Iron metabolism and erythropoiesis after surgery. *Br J Surg* 85: 41-45.

van Veldhuisen DJ, Dickstein K, Cohen-Solal A. et al. (2007). Randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of two dosing regimens of darbepoetin alfa in patients with heart failure and anaemia. *Eur Heart J.* 28:2208-2216.

Vincent JL, Baron JF, Reinhart K. et al. (2002). Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA* 288(12): 1499-1507.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL. et al. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet. 21: 195-199.*

Wallader ML, Leibold EA, Eisenstein RS. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta. 1763(7): 668-89.*

Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J. et al. (2006). Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science 314: 1903-1908.*

Weaver J, Pollack S, Zhan H. (1989). Low molecular weight iron from guinea pig reticulocytes isolated by Sephadex G-25 chromatography. *Eur J Haematol. 43(4): 321-7.*

Weiss G. (2002). Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Rev. 16: 87-96.*

Weiss G, Goodnough LT. (2005). Anemia of chronic disease. *N Engl J Med 352: 1011-1023.*

Westenbrink BD, Visser FW, Voors AA. et al. (2007). Anaemia in chronic heart failure is not only related to impaired renal perfusion and blunted erythropoietin production, but to fluid retention as well. *Eur Heart J. 28:166-171.*

Wrighting DM and Andrews NC. (2008). *Current Topics in Developmental Biology, 82, chapter 6.*

Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science 300: 650-653.*

Wood RJ. (2004). The iron-heart disease connection: is it dead or just hiding; *Ageing Res Rev. 3: 355-367.*

Wu KJ, Polack A, Dalla-Favera R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 283(5402): 676-9.

Xu J, Marzetti E, Seo A, Kim JS. (2010). The emerging role of iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 131: 487-493.

Yang F, Lum JB, McGill JR, Moore CM. et al. (1984). Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(9): 2752-6.

Yongmin MA, de Groot H, Liu Z. et al. (2006). Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinore fluorescent probes. *Biochem J.* 395: 49-55.

You SA, Wang Q. (2005). Ferritin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 357: 1-16.

Youdim MB. (2008). Brain iron deficiency and excess; cognitive impairment and neurodegeneration with involvement of striatum and hippocampus. *Neurotox Res.* 14(1): 45-56.

Yu Z, Persson HL, Eaton JW, Brunk UT. (2003). Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 34(10): 1243-52.

Yuan XM, Li W. (2008). Iron involvement in multiple signaling pathways of atherosclerosis: a revisited hypothesis. *Curr Med Chem* 15(21): 2157-72.

Zhou G, Miura Y, Shoji H. (2001). Platelet monoamine oxidase B and plasma beta-phenylethylamine in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70(2): 229-31.