

## ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ (Labile Iron Pool – LIP) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Χ. Βλάχου, Α. Μπαρμπούτη, Δ. Γαλάρης

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή

### Εισαγωγή

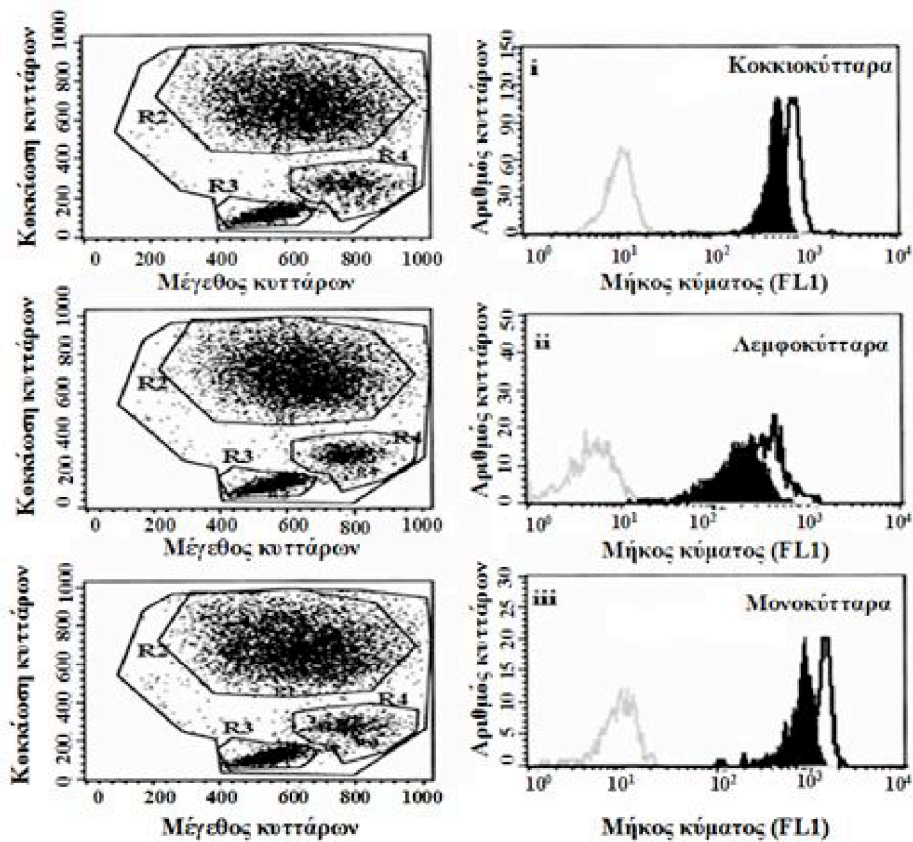
Ο σίδηρος αποτελεί ένα ιχνοστοιχείο ζωτικής σημασίας για τη διεκπεραίωση μιας σειράς βασικών λειτουργιών που χαρακτηρίζουν τη ζωή (μεταφορά οξυγόνου, σύνθεση του DNA, μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και μεταβολισμός ξενοβιοτικών ενώσεων μεταξύ άλλων). Από την άλλη πλευρά, ο σίδηρος κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι ιδιαίτερα τοξικός λόγω της ικανότητας του να καταλύει το σχηματισμό δραστικών ελευθέρων ριζών μέσω της αντίδρασης Fenton (1). Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα και οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, ώστε να αποφεύγονται οι βλαβερές επιδράσεις του. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν με ακρίβεια την απορρόφηση, τη μεταφορά και την ασφαλή αποθήκευση της περίσσειας του σιδήρου (2,3). Παραδείγματα πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες, αποτελούν η τρανσφερίνη, ο υποδοχέας της τρανσφερίνης, η φερριτίνη, η εψιδίνη, η φερροπορτίνη κ.ά. (4,5).

Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό σιδήρου βρίσκεται ελεύθερο ή χαλαρά συνδεδεμένο σε διάφορα ενδοκυττάρια μόρια και αποτελεί τη λεγόμενη «δεξαμενή οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου» (labile iron pool - LIP). Ο σίδηρος αυτός σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίων) οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών ελευθέρων ριζών με τοξικές για το κύτταρο επιπτώσεις. Μέχρι πρότινος, η εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου ήταν ανέφικτη σε ζωντανά κύτταρα. Σήμερα όμως, η εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) είναι δυνατή μέσω νέων μεθοδολογιών που στηρίζονται στη χρήση κατάλληλων ουσιών που φθορίζουν, όπως η καλσεΐνη, και εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων. Η καλσεΐνη έχει την ικανότητα να δεσμεύει δισθενή και τρισθενή ιόντα σιδήρου με μια σταθερά συγγένειας  $10^{14}$  και  $10^{24}$  αντίστοιχα. Η παρουσία μιας ακετομεθόξυ ομάδας στο αρχικό μόριο, καλσεΐνη – AM, διευκολύνει τη διάχυση του μορίου διαμέσου των μεμβρανών, ενώ η ενδοκυτταρική διάσπαση των εστερικών δεσμών από εξειδικευμένες εστεράσες έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της καλσεΐνης στο κύτταρο. Η δέσμευση του σιδήρου και άλλων δισθενών μετάλλων από την καλσεΐνη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού της, ενώ η επακόλουθη προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή του salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) οδηγεί στην απομάκρυνση του σιδήρου από την καλσεΐνη και την επακόλουθη αύξηση στο φθορισμό της καλσεΐνης (6). Η οφειλόμενη στο SIH αύξηση του μέσου κυτταρικού φθορισμού (ΔΦθορισμού) σε κάθε τύπο κυττάρου εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες και αντανακλά τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στον κάθε τύπο κυττάρου.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ίδια αρχή σε συνδυασμό με τα τεράστια πλεονεκτήματα που προσφέρει η σύγχρονη τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του LIP σε κύτταρα ολικού αίματος ανθρώπου. Με τη μεθοδολογία αυτή δε χρειάζεται ο διαχωρισμός των διαφόρων ειδών κυττάρων του αίματος, αλλά η ανάλυση για κάθε κύτταρο ξεχωριστά στηρίζεται στην ομαδοποίηση που επιτυγχάνει η συσκευή κατά την ανάλυση του δείγματος. Έτσι, είναι δυνατή η εκτίμηση του LIP ταυτόχρονα σε όλα τα είδη κυττάρων που περιέχονται σε ένα δείγμα ανθρώπινου αίματος (ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα) (7).

### Αποτελέσματα

Η παραπάνω μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου σε τρεις διαφορετικούς υποπληθυσμούς λευκοκυττάρων (κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) 41 υγιών ατόμων (Εικόνα 1). Ο μέσος όρος των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, εκφρασμένος σε αυθαίρετες μονάδες, κατεγράφη για τα σαράντα ένα υγιή άτομα και ήταν:  $214,4 \pm 43,1$ ,  $124,0 \pm 23,3$  και  $386,8 \pm 66,3$  au για τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις τιμές αυτές, ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, των λεμφοκυττάρων τα μικρότερα, ενώ γι' αυτόν των κοκκιοκυττάρων οι τιμές βρίσκονται ενδιάμεσα.



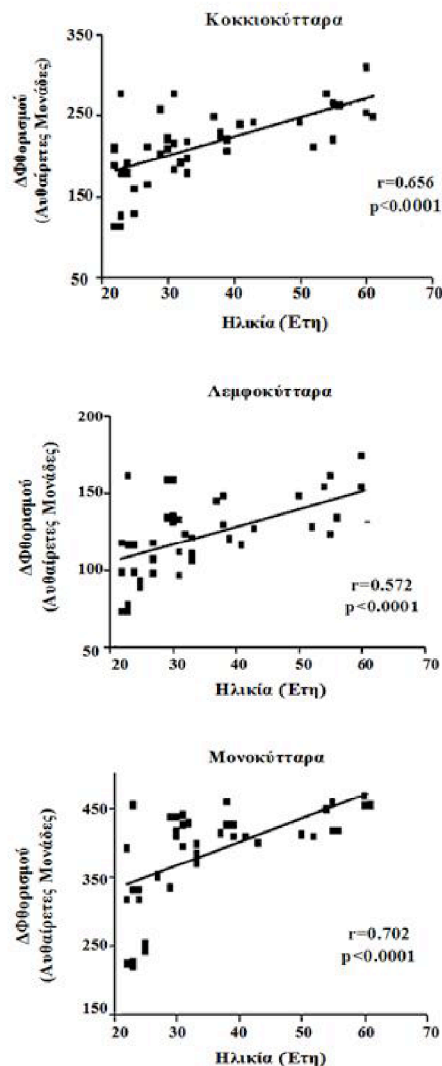
Εικόνα 1. Ανάλυση λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής και εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP).

Λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ( $1,5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) αναλύθηκαν με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες (μέγεθος και κοκκίωση κυττάρων) (Α) και τον αυτοφθορισμό τους (γκρι γραμμή στα ιστογράμματα στο Δ). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώασθησαν με 5 nM καλσεΐνη – AM για δέκα λεπτά και αμέσως μετά αναλύθηκαν για τις ίδιες παραμέτρους (Β και γεμάτες κορυφές στα ιστογράμματα στο Δ). Τελικά, 100  $\mu$ M SIH προστέθηκαν στο ίδιο κυτταρικό εναιώρημα και πέντε λεπτά αργότερα τα κύτταρα αναλύθηκαν για τις ίδιες φυσικοχημικές παραμέτρους και τον πράσινο φθορισμό (Γ και η μαύρη γραμμή στα ιστογράμματα στο Δ). Στα στικτογράμματα, η ομάδα R2 αντιπροσωπεύει τα κοκκιοκύτταρα, η R3 τα λεμφοκύτταρα και η R4 τα μονοκύτταρα. Η αύξηση στο μέσο φθορισμό των κυττάρων μετά την προσθήκη του SIH εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες και αντανάκλα τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου που δεσμεύονται από την καλσεΐνη.

Στην κλινική πράξη τα επίπεδα του σιδήρου εκτιμώνται από μία σειρά δεικτών στους οποίους περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων: α) η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη, β) του ολικού σιδήρου του πλάσματος, γ) της ολικής ικανότητας δέσμευσης σιδήρου (total iron binding capacity, TIBC), δ) του κορεσμού της τρανσφερίνης, και ε) της φερριτίνης του πλάσματος ως δείκτη των επιπέδων σιδήρου του σώματος. Έτσι, σε ένα επόμενο στάδιο αυτής της μελέτης εξετάστηκε η συσχέτιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου με τους προαναφερθέντες δείκτες.

Η συσχέτιση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου με όλες τις προηγούμενες παραμέτρους ήταν θετική μόνο στην περίπτωση της ηλικίας. Η αύξηση της ηλικίας στο συγκεκριμένο δείγμα υγιών ατόμων συνοδεύεται από την αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου και στους τρεις τύπους κυττάρων (Εικόνα 2). Η συσχέτιση μεταξύ των δύο 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.

Η θετική αυτή συσχέτιση υποδηλώνει ότι τα κύτταρα ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας είναι επιρρεπή σε οξειδώσεις κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες. Γενικά, η εκτίμηση των επιπέδων του LIP μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο σε περιπτώσεις όπου αναζητάται μια σύνδεση μεταξύ του σιδήρου και παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.



**Εικόνα 2.** Αύξηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) σε σχέση με την ηλικία.

Λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ( $1,5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) από υγιή άτομα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP). Οι τιμές των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (ΔΦθορισμός, κάθετος άξονας) συσχετίστηκαν με την ηλικία των δοτών (έτη, οριζόντιος άξονας). Η συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων υπολογίστηκε μέσω των τιμών του συντελεστή Spearman's  $r$  για τα κοκκιοκύτταρα (Α), τα λεμφοκύτταρα (Β) και τα μονοκύτταρα (Γ), αντίστοιχα.

### Βιβλιογραφία

1. Galaris D. and Pantopoulos K. (2008) Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 45: 1-23.
2. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. (2004) Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 117: 285-297.
3. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. (2008) Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 72-81.
4. Fillebeen C, Caltagirone A, Martelli A, Moulis JM, Pantopoulos K. (2005) IRP1 Ser-711 is a phosphorylation site, critical for regulation of RNA binding and aconitase activities. *Biochem J* 388: 143-150.
5. Papanikolaou G, Pantopoulos K. (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 199-211.
6. Kakhlon O, Cabantchik ZI. (2002) The labile iron pool characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med.* 2002 Oct 15;33(8):1037-46. Review.
7. Doulias PT, Vlachou C, Boudouri C, Kanavaros P, Siamopoulos KC, Galaris D. (2008) Flow cytometric estimation of 'labile iron pool' in human white blood cells reveals a positive association with ageing. *Free Radic Res. Mar,* 42 (3): 253-9.