

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ &  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ  
ΕΙΔΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ EX VIVO ΚΑΙ IN VIVO  
ΜΟΝΤΕΛΑ MUCORMYCOSIS

ΙΩΑΝΝΑ ΑΡΓΥΡΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:  
ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΜΗΛΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Οι μύκητες στη φύση.....	6
1.2 Διηθητικές Λοιμώξεις μυκήτων.....	6
1.3 Μηχανισμοί Δράσης Μυκήτων Έναντι των Κυττάρων του Ανοσοποιητικού .....	8
1.3.1 Κάλυψη Ανοσοδιεγερτικών Ομάδων.....	8
1.3.2 Ανάπτυξη και Πολλαπλασιασμός.....	9
1.4 Μυκητιακές Λοιμώξεις.....	11
1.4.1 Ασπεργίλλωση.....	11
1.4.2 Θεραπευτική Προσέγγιση Διηθητικής Ασπεργίλλωσης.....	13
1.4.3 Μουκορμύκωση.....	14
1.4.4 Άμυνα του Οργανισμού Κατά της Μουκορμύκωσης.....	17
1.4.5 Ο Ρόλος του Σιδήρου στη Μουκορμύκωση.....	18
1.4.5.1 Εξωκυττάρια Ανάπτυξη.....	18
1.4.5.2 Ενδοκυττάρια Ανάπτυξη.....	20
1.4.6 Ο Ρόλος του Σιδήρου στα Βιολογικά Συστήματα.....	21
1.5 Χαρακτηρισμός Ειδών Μετάλλων.....	23
1.5.1 Υπάρχουσες Τεχνικές Ειδοταυτοποίησης Σιδήρου σε Βιολογικά Δείγματα.....	24

<b>2. Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Οργανολογία – Εργαστηριακός εξοπλισμός.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Αντιδραστήρια .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Μέθοδοι.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS).....</b>	<b>32</b>
<b>2.5 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (SEC).....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.1 Στήλη Χρωματογραφίας Μοριακού Αποκλεισμού - HiTrap Desalting.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC).....</b>	<b>37</b>
<b>2.6.1 Στήλη Χρωματογραφίας Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC).....</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Εφαρμογή της Μεθόδου SEC-ICP MS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1 Περιγραφή της Πειραματικής Διάταξης SEC-ICP-MS.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.1.1 Στήλη SEC Συνδεδεμένη σε Αντλία Υγρής Χρωματογραφίας.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.1.2 Στήλη SEC Συνδεδεμένη στην Περισταλτική Αντλία του ICP-MS.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7.2 Περιγραφή της Πειραματικής Πορείας SEC-ICP-MS.....</b>	<b>46</b>
<b>2.7.2.1 Πειραματική Πορεία Διάταξης : Στήλη SEC Συνδεδεμένη σε Αντλία Υγρής Χρωματογραφίας.....</b>	<b>46</b>
<b>2.7.2.2 Πειραματική Πορεία Διάταξης : Στήλη SEC Συνδεδεμένη στην Περισταλτική Αντλία του ICP-MS.....</b>	<b>48</b>
<b>2.8 Ανάπτυξη και Εφαρμογή της Μεθόδου HILIC-ICP MS.....</b>	<b>49</b>

2.8.1 Περιγραφή της Πειραματικής Διάταξης HILIC-ICP-MS.....	50
2.8.2 Περιγραφή της Πειραματικής Πορείας HILIC-ICP-MS.....	52
3. Αποτελέσματα.....	53
3.1 Μελέτη της επίδρασης εξωγενών πηγών σιδήρου στην παθογένεση της Μουκορμύκωσης.....	53
3.1.1 Η υπερφόρτωση μακροφάγων μυελού των οστών με FeCl <sub>3</sub> και Deferoxamine οδηγεί σε ήπια αύξηση της ανάπτυξης του <i>Rhizopus delemar</i> .....	53
3.1.2 Επίδραση διαφορετικών εξωγενών πηγών σιδήρου σε μακροφάγα κύτταρα μολυσμένα με <i>Rhizopus delemar</i> .....	57
3.2 Η αναγωγή σιδήρου STEAP 4 ως ρυθμιστής της λοίμωξης από το μύκητα <i>Rhizopus delemar</i> .....	59
3.3 Ο ρόλος του σιδήρου στην παθογένεση της Μουκορμύκωσης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.....	59
3.3.1 Η οξέωση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη λοίμωξης σε in vivo μοντέλο διαβήτη ποντικών.....	59
3.4 Μέθοδος SEC-ICP MS για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σιδήρου και ανίχνευση ανόργανων μορφών σιδήρου.....	65
3.4.1 SEC συνδεδεμένη σε αντλία υγρής χρωματογραφίας.....	65
3.4.2 SEC συνδεδεμένη στην περισταλτική αντλία του ICP-MS.....	76
3.5 Μέθοδος HILIC-ICP MS για το διαχωρισμό ανόργανων μορφών σιδήρου.....	88

<b>3.6. Φασματομετρία μάζας .....</b>	<b>98</b>
<b>3.6.1 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο συναρμογής του σιδήρου στο μόριο 2,6 pyridine dicarboxylic acid.....</b>	<b>98</b>
<b>3.6.1.1 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο του μορίου 2,6 pyridine dicarboxylic acid.....</b>	<b>98</b>
<b>3.6.1.2 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο συναρμογής τρισθενούς σιδήρου στο μόριο 2,6 pyridine dicarboxylic acid.....</b>	<b>100</b>
<b>4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....</b>	<b>104</b>
<b>5.</b>	
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>109</b>

## Περίληψη

Προηγούμενες μελέτες αποδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο των διαταραχών ρύθμισης του σιδήρου για την ανάπτυξη θανατηφόρων λοιμώξεων από υφομύκητες (μούχλες) στον άνθρωπο. Οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης του σιδήρου είναι εν πολλοίς άγνωστοι, και η μελέτη τους είναι σημαντική για την κατανόηση της παθογένεσης των μυκητιάσεων και της ανάπτυξης νέων θεραπειών.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι :

1. Βελτιστοποίηση πειραματικών μοντέλων λοιμώξεων μακροφάγων (φαγοκυττάρων) με μύκητες σε περιβάλλον περίσσειας σιδήρου.
2. Ανάπτυξη μεθόδων μέτρησης του ενδοκυττάριου σιδήρου (ολικού και διαθέσιμου για τα παθογόνα) με τεχνικές ανοσοφθορισμού και αναλυτικής χημείας τόσο σε επίπεδο κυττάρων όσο και στο φαγόσωμα, την κυτταρική μεμβράνη που περιβάλλει το μύκητα ενδοκυττάρια.
3. Ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού και προσδιορισμού των διαφορετικών ειδών σιδήρου σε επίπεδο κυττάρων και σε φαγοσώματα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης οδηγούν στην ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων με χορήγηση σιδήρου σε θρεπτικό υλικό με συνθήκες που οδηγούν σταθερά στην εκβλάστηση των ενδοκυττάριων σπορίων του μύκητα μέσα από τα μακροφάγα.

Επιπρόσθετα, η αναλυτική τεχνική ICP-MS επιτρέπει τον προσδιορισμό του ολικού σιδήρου σε κύτταρα με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα και σε συνδυασμό με τις μεθόδους της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων οδηγεί στην ταυτοποίηση των διαφορετικών ειδών του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο.

Συνολικά τα πειράματα οδηγούν στην ανάπτυξη εργαλείων για τη μελλοντική μελέτη μοριακών ρυθμιστών του σιδήρου σε γενετικά μοντέλα, μετά από απαλοιφή γονιδίων που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του σιδήρου στα μακροφάγα.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Οι μύκητες στη φύση**

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε Βασίλεια των έμβιων όντων και απαρτίζονται από μονοκύτταρους καθώς και πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι πανταχού παρόντες, και μπορούν να ανευρεθούν από το έδαφος έως και τον αέρα. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους αποτελεί η αποικοδόμηση οργανικής ύλης νεκρών ή ζώντων οργανισμών για την παροχή απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Στην πρώτη περίπτωση αναφέρονται με τον όρο σαπρόφυτα. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από ζωντανό οργανισμό χαρακτηρίζονται ως παράσιτα.

### **1.2 Διηθητικές Λοιμώξεις Μυκήτων**

Περίπου πέντε εκατομμύρια είδη μυκήτων υπολογίζεται πως βρίσκονται στην επιφάνεια της γης. Ωστόσο, μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός αυτών των ειδών, 1/10.000, δύναται να προκαλέσει ασθένειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Για τη μόλυνση του ανθρώπινου οργανισμού πρέπει να πληρούνται τα παρακάτω τέσσερα κριτήρια<sup>1</sup> :

1. Ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και άνω
2. Διείσδυση σε εσωτερικά όργανα διαπερνώντας τις γραμμές άμυνας του οργανισμού
3. Δυνατότητα απορρόφησης συστατικών του ανθρώπινου ιστού
4. Ανθεκτικότητα στις ανοσολογικές άμυνες του οργανισμού

Τα προαναφερθέντα κριτήρια πληρούνται από τις συνομοταξίες: *Zygomycota*, *Entomophthorales*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*.

Μια περαιτέρω διάκριση των μυκητιακών λοιμώξεων μπορεί να γίνει ανάλογα με τη διάκριση των παθογόνων μυκήτων σε δύο κατηγορίες<sup>2</sup> :

1. Πρωτογενείς παθογόνοι μύκητες
2. Ευκαιριακοί παθογόνοι μύκητες

Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται σε παθογόνους μύκητες που προσβάλλουν υγιείς ξενιστές χωρίς ενδείξεις ανοσοκαταστολής. Η λοίμωξη προέρχεται συνήθως από εισπνοή των κονιδίων των μυκήτων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis*.

Εν αντιθέσει, στη δεύτερη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται παθογόνοι μύκητες που προκαλούν λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των καρκινοπαθών, ασθενών που πάσχουν από τον ιό HIV και ασθενών που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση και μεταμόσχευση οργάνων. Η μόλυνση μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω του αναπνευστικού είτε μέσω του γαστρεντερικού συστήματος. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι οι *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffeii*, *Zygomycetes*, *Trichosporon beigeli*, and *Fusarium* spp.

Οι μυκητιακές λοιμώξεις είναι σύνηθες φαινόμενο στη φύση. Ωστόσο, η περίπτωση δημιουργίας διηθητικών λοιμώξεων, στον άνθρωπο είναι εξαιρετικά σπάνιες.

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εντοπίζεται στις παρακάτω κατηγορίες μυκήτων.

- Μούχλες
  - *Aspergillus species (spp)*
  - *Mucorales*
- Ζύμες
  - *Cryptococcus spp*



- *Candida spp*
- Άλλα είδη
  - *Pneumocystis*

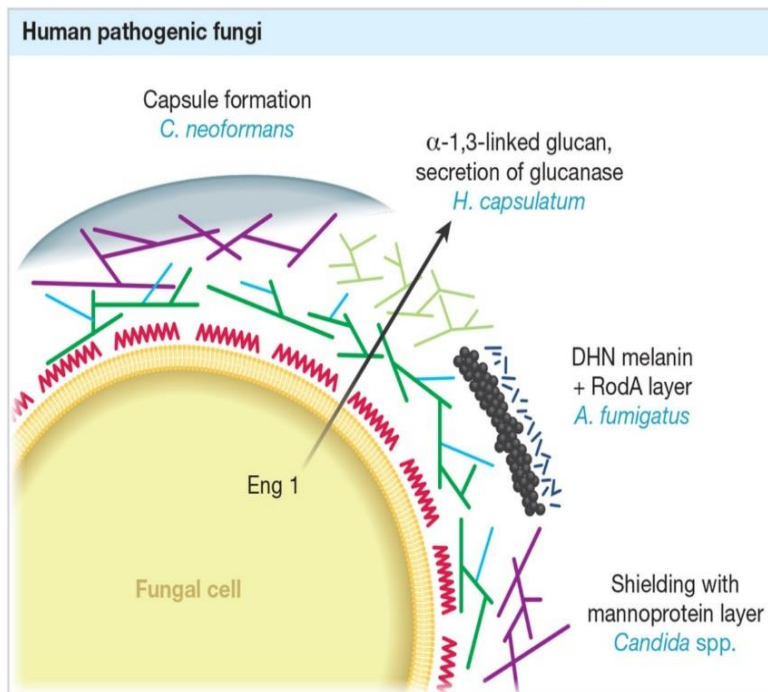
Η επαφή ενός παθογόνου μύκητα με τον οργανισμό προκαλεί μια ανοσολογική απάντηση που οδηγεί στον περιορισμό και τελικά την καταστροφή του. Για το λόγο αυτό, οι μικροοργανισμοί από πλευράς τους έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αποφυγής αναγνώρισής τους από τον ξενιστή και χειραγώγησης της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού.

### **1.3 Μηχανισμοί Δράσης Μυκήτων Έναντι των Κυττάρων του Ανοσοποιητικού**

#### **1.3.1 Κάλυψη Ανοσοδιεγερτικών Ομάδων**

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί το πρώτο ανοσοδιεγερτικό τμήμα του μύκητα που έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή. Αποτελείται κατά κόρον από χιτίνη, γλυκάνες, πολυσακχαρίτες και χρωστικές ουσίες. Η αναγνώριση των ομάδων αυτών σηματοδοτεί μια εξειδικευμένη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι στο εκάστοτε παθογόνο. Κατά κύριο λόγο, η β-γλυκάνη είναι το μόριο του κυτταρικού τοιχώματος που αναγνωρίζεται από υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή (PRRs) όπως είναι η Dectin-1.

Η απόκρυψη των ομάδων αυτών χρησιμοποιείται ως μηχανισμός αποφυγής αναγνώρισής τους από τον ξενιστή. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**, το παθογόνο *Cryptococcus neoformans* συνθέτει μια κάψουλα πολυσακχαριτών για να προστατεύσει τη β-γλυκάνη, ενώ το *Histoplasma capsulatum* προστατεύει τη β-γλυκάνη επικαλύπτοντάς την με ένα στρώμα α 1,3-γλυκανών μετατρέποντάς τη σε μη ανοσοδιεγερτική ομάδα. Με παρόμοιο τρόπο, ο *Aspergillus fumigatus* χρησιμοποιεί μια υδρόφοβη πρωτεΐνη, τη RodA για την κάλυψη της β-γλυκάνης καθώς και η *Candida spp.* (mannoproteins).



**Εικόνα 1. Μηχανισμοί προστασίας ανθρωπίνων παθογόνων μυκήτων. Οι ανθρωπίνους παθογόνοι μύκητες χρησιμοποιούν εκλεπτυσμένες στρατηγικές κάλυψης ανοσοδιεγερτικών ομάδων που βρίσκονται στην επιφάνειά τους από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή. Κατά κύριο λόγο οι στρατηγικές αυτές σκοπεύουν στην κάλυψη της β-γλυκάνης<sup>3</sup>.**

κύτταρα μπλοκάρει την φαγοκυττάρωσή του από τα μακροφάγα και διευκολύνει τη διήθησή του στο κυκλοφορικό σύστημα του ξενιστή. Παρομοίως, το παθογόνο *Aspergillus fumigatus* περιβάλλεται από ένα στρώμα DHN μελανίνης που εμποδίζει την έκθεση των ανοσοδιεγερτικών ομάδων που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα<sup>3</sup>.

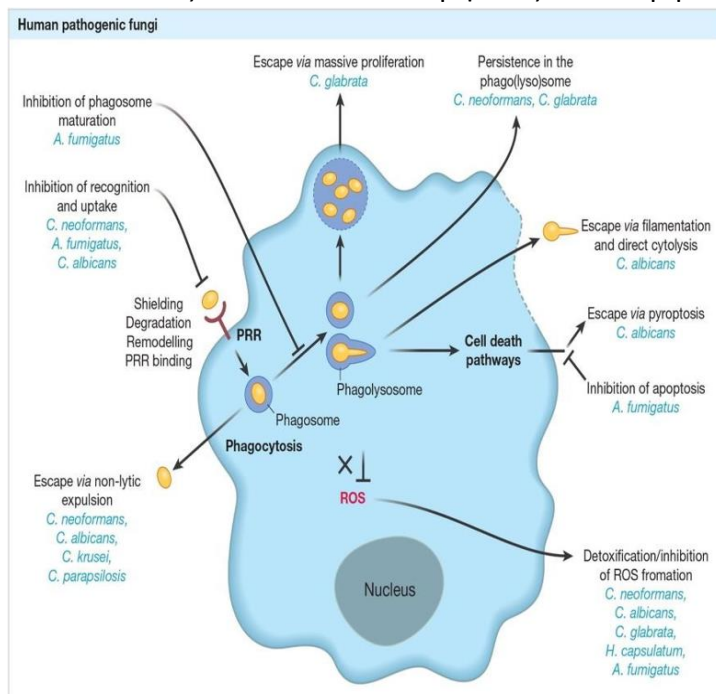
### 1.3.2 Ανάπτυξη και Πολλαπλασιασμός

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και μύκητα κατά τη διάρκεια της λοίμωξης μπορεί να οδηγήσει τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε μέσω ρυθμιζόμενων διαδικασιών είτε να είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης βλάβης των κυττάρων. Το τελευταίο συμβαίνει όταν κάποιοι παθογόνοι μύκητες παρασιτούν στο εσωτερικό των κυττάρων πολλαπλασιάζοντας το φορτίο τους και αναπτύσσοντας τη

Η αποφυγή της ανοσολογικής αναγνώρισης μπορεί να επιτευχθεί ακόμη μέσω της πρόσδεσης και αποικοδόμησης πρωτεϊνικών παραγόντων του ξενιστή. Το παθογόνο *Cryptococcus neoformans* εκκρίνοντας μια πρωτεΐνη που προσδέεται στον κατάλληλο υποδοχέα στα μακροφάγα

μάζα τους. Σε αυτή την περίπτωση επέρχεται κυτταρικός θάνατος χωρίς να ενεργοποιούνται προγράμματα κυτταρικού θανάτου αλλά λόγω των επιβλαβών επιπτώσεων της μυκητιακής μόλυνσης των κυττάρων του ξενιστή.

Στην **Εικόνα 2** συνοψίζονται οι μηχανισμοί που επιτάσσονται από πλευράς των παθογόνων για την επίτευξη της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους ενδοκυττάρια. Το παθογόνο *Cryptococcus neoformans* παρασιτεί και πολλαπλασιάζεται στο φαγολυσώσωμα σε ένα όξινο περιβάλλον, το pH του οποίου διατηρείται σταθερό από τη ρυθμιστική ικανότητα του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Με παρόμοιο μηχανισμό, η *Candida glabrata* παρασιτεί και πολλαπλασιάζεται σε ένα μη όξινο περιβάλλον στο εσωτερικό του



**Εικόνα 2. Μηχανισμοί διαφυγής των ανθρώπινων παθογόνων μυκήτων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Εκτός από την κάλυψη ανοσοδιεγερτικών ομάδων, είναι απαραίτητη η χρήση μηχανισμών για αποφυγή ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης. Οι ανθρώπινοι παθογόνοι μύκητες έρχονται αντιμέτωποι με κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα.<sup>3</sup>**

φαγολυσοσώματος. Η συνεχής ανάπτυξη του μύκητα οδηγεί σε λύση του κυττάρου και απελευθέρωση του παθογόνου.

Αντιθέτως, η *Candida albicans* μετά τη φαγοκυττάρωσή της δημιουργεί υφές που προκαλούν βλάβη στη μεμβράνη του φαγοσώματος ήδη λίγες ώρες μετά τη μόλυνση.

Ο παθογόνος μύκητας *Aspergillus fumigatus* μέσω της μελανίνης του κυτταρικού του τοιχώματος

που αναφέρθηκε και παραπάνω, προστατεύει τις ανοσοδιεγερτικές του ομάδες και

αναστέλλει την ωρίμανση του φαγοσώματος, δηλαδή τη σύντηξή του με τα λυσοσώματα που φέρουν υδρολυτικά ένζυμα και συντελούν στην αντιμετώπιση του παθογόνου. Μετά την αναδιαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος και την απομάκρυνση της μελανίνης από τα διογκωμένα κονίδια του μύκητα ενεργοποιείται ο μηχανισμός (LC3 associated phagocytosis) που συντελεί στην εξουδετέρωση του μύκητα<sup>4</sup>.

## 1.4 Μυκητιακές Λοιμώξεις

### 1.4.1 Ασπεργίλλωση

Η διηθητική ασπεργίλλωση είναι η πιο κοινή λοίμωξη από μούχλα και προκαλείται από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Ο *Aspergillus* είναι ένας αερομεταφερόμενος σαπροφυτικός οργανισμός με πανταχού παρούσα κατανομή στη φύση. Φυσιολογικά, εκατοντάδες κονίδια (σπόρια) *Aspergillus* που υπάρχουν στον αέρα εισπνέονται από ανθρώπους. Τα εισπνεόμενα κονίδια εξουδετερώνονται συνεχώς στον πνεύμονα μέσω μιας πολύ συντονισμένης ανοσολογικής απόκρισης χωρίς να προκαλούν φλεγμονή ή ασθένεια. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της διηθητικής ασπεργίλλωσης είναι ο *Aspergillus fumigatus*, ο οποίος ευθύνεται για το 92% των περιπτώσεων, ακολουθούμενος από τους *A. flavus*, *A. niger* και *A. terreus*.

Ο *Aspergillus* προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών ανάλογα με την ανοσολογική κατάσταση του ασθενή<sup>5</sup>.

- **Μη Διηθητική Ασπεργίλλωση**

Σε άτομα που πάσχουν από άσθμα και κυστική ίνωση, είναι συχνή η εμφάνιση βρογχοπνευμονικής ασπεργίλλωσης, ενώ μια μορφή μη διηθητικής ασπεργίλλωσης προκαλείται και από την έκθεση σε μεγάλο μυκητιακό φορτίο, το οποίο εγκαθίσταται σε κοιλότητες του πνεύμονα που έχουν υποστεί βλάβες από άλλες ασθένειες.

- **Διηθητική Ασπεργίλλωση**

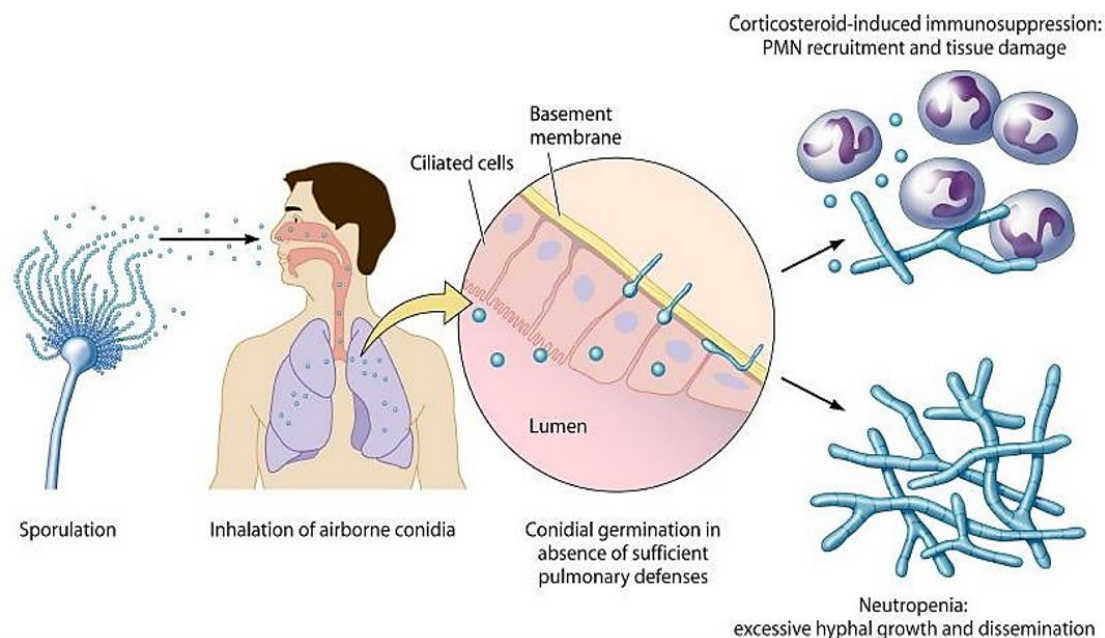
Η διηθητική ασπεργίλλωση είναι η πιο σοβαρή ασθένεια που σχετίζεται με τον *Aspergillus*, πλήττοντας σοβαρά ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι κατηγορίες ασθενών που συγκαταλέγονται στην ομάδα κινδύνου για την ασθένεια αυτή απαριθμούνται παρακάτω:

1. Ουδετεροπενία
2. Αιματολογικές κακοήθειες
3. Μεταμοσχεύσεις οργάνων
4. Θεραπεία με κορτικοστεροειδή
5. Χρόνια Κοκκιωματώδης Νόσος (CGD)
6. Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

Το ποσοστό θνητότητας για τους ασθενείς αυτούς αγγίζει το 40-90%, ανάλογα με το βαθμό ανοσοκαταστολής, το σημείο μόλυνσης και τη θεραπεία των παραπάνω ασθενών.

Η μόλυνση όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3** ξεκινάει από την εισπνοή αερομεταφερόμενων κονιδίων του μύκητα και την εναπόθεσή τους στα βρογχίδια και τις κυψελίδες του πνεύμονα. Στους υγιείς ανθρώπους, τα κόνidia που δεν απομακρύνονται από τους βλεννογόνους έρχονται σε επαφή με τα επιθηλιακά και κυψελιδικά κύτταρα του πνεύμονα. Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι υπεύθυνα για τη φαγοκυττάρωση και εξουδετέρωση του μύκητα όπως και για την επαγωγή μιας αντιφλεγμονώδους απάντησης που οδηγεί στην προσέλκυση των ουδετερόφιλων στο σημείο της μόλυνσης<sup>6</sup> Τα κόνidia που διαφεύγουν των μακροφάγων και εκβλαστάνουν γίνονται οι στόχοι των ουδετερόφιλων που δύνανται να καταστρέψουν τις υφές<sup>7</sup>. Ο κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικής ασπεργίλλωσης προκύπτει κυρίως από δυσλειτουργίες σε αυτές τις άμυνες του ξενιστή σε συνδυασμό

με μυκητιακές ιδιότητες που επιτρέπουν την επιβίωση του *A. fumigatus* και ανάπτυξη του στο περιβάλλον του πνεύμονα.



**Εικόνα 3. Κύκλος ζωής του *Aspergillus fumigatus*. Ο *Aspergillus fumigatus* είναι πανταχού παρόν στο περιβάλλον, και η αγενής αναπαραγωγή του οδηγεί στην παραγωγή αερομεταφερόμενων κονιδίων. Η εισπνοή κονιδίων του μύκητα αυτού από συγκεκριμένες ομάδες ανοσοκατεσταλμένων ασθενών έχει ως αποτέλεσμα την εγκαθίδρυσή τους στην πνευμονική κοιλότητα και την ανάπτυξη υφών. Η θεραπεία με κορτικοστεροειδή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής από την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, ενώ στην περίπτωση της ουδετεροπενίας υπάρχει ανεξέλεγκτη ανάπτυξη υφών χωρίς την ύπαρξη φλεγμονής.<sup>7</sup>**

#### 1.4.2 Θεραπευτική Προσέγγιση Διηθητικής Ασπεργίλλωσης

Η αντιμετώπιση των παραπάνω λοιμώξεων απαιτεί μια πολυδιάστατη προσέγγιση λόγω της ιδιάζουσας παθογένειας.

Το επιλεγμένο αντιμυκητιακό έναντι των λοιμώξεων από τον *Aspergillus* είναι η αμφοτερικίνη Β. Το αντιμυκητιακό αυτό προσδένεται στην εργοστερόλη, ένα συστατικό της μεμβράνης των μυκήτων και δημιουργεί πόρους από τους οποίους εξέρχονται κατιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  και ανιόντα  $Cl^-$  και προκαλούν τελικά τον κυτταρικό θάνατο<sup>8</sup>.

Ωστόσο, η αμφοτερουκίνη Β μπορεί να έχει και τοξική επίδραση στα κύτταρα του ξενιστή καθώς έχουν παρόμοια δομή με τα κύτταρα των μυκήτων. Μπορεί δηλαδή να δεσμευτεί στη χοληστερόλη της μεμβράνης των κυττάρων και να διαταράξει το μεμβρανικό φραγμό τους προκαλώντας κυτταρικό θάνατο.

Για την αντιμετώπιση της τοξικότητας χρησιμοποιούνται λιποσωμικές δομές του αντιμυκητιακού.

Μια διαφορετική προσέγγιση που μπορεί να ακολουθηθεί είναι η χορήγηση αζολών<sup>9</sup>. Οι αζόλες δρουν αναστέλλοντας τη μετατροπή της λανοστερόλης σε εργοστερόλη, βασικό συστατικό της μεμβράνης των μυκήτων, αναστέλλοντας τη διμεθυλάση της λανοστερόλης. Χρησιμοποιούνται κυρίως τριαζόλες όπως η ποζακοναζόλη και σε κάποιες πρόσφατες περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει απόκριση στα παραπάνω αντιμυκητιακά ιζαβουκοναζόλη.

Παρά τη χρήση των παραπάνω αντιμυκητιακών παραγόντων για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων συχνά τα αποτελέσματα δεν είναι τα αναμενόμενα και αυξάνεται το ποσοστό θανάτου των ασθενών. Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα της θεραπείας είναι και ο βαθμός ανοσοκαταστολής των ασθενών.

### 1.4.3 Μουκορμύκωση

Η Μουκορμύκωση, ή όπως προηγουμένως ονομαζόταν Ζυγομυκητίαση, είναι μια σπάνια αλλά αναδυόμενη διηθητική λοίμωξη μούχλας και προκαλείται από ευκαιριακούς μύκητες που ανήκουν στην τάξη *Mucorales*. Ο *Rhizopus oryzae* είναι ο οργανισμός που απομονώνεται από ασθενείς και είναι υπεύθυνος για το 70% των περιστατικών Μουκορμύκωσης. Σε σύγκριση με άλλες διηθητικές μολύνσεις μούχλας, η Μουκορμύκωση είναι η πιο καταστροφική μυκητιακή ασθένεια με ποσοστά θνησιμότητας 30-50%, τα οποία προσεγγίζουν το 100% σε περιπτώσεις μεγάλης διασποράς<sup>10</sup>. Αυτή η μυκητιακή ασθένεια έχει κοινά επιδημιολογικά, κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά με άλλες διηθητικές μολύνσεις μούχλας, παρόλα αυτά, έχει επίσης μοναδικά χαρακτηριστικά ασθένειας, τα οποία πιθανώς

αντικατοπτρίζουν τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του *Mucorales* με το ανοσοποιητικό σύστημα.

Ανάλογα την κλινική εικόνα που παρουσιάζει ο εκάστοτε ασθενής, η διηθητική Μουκορμύκωση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 6 ομάδες<sup>11</sup>:

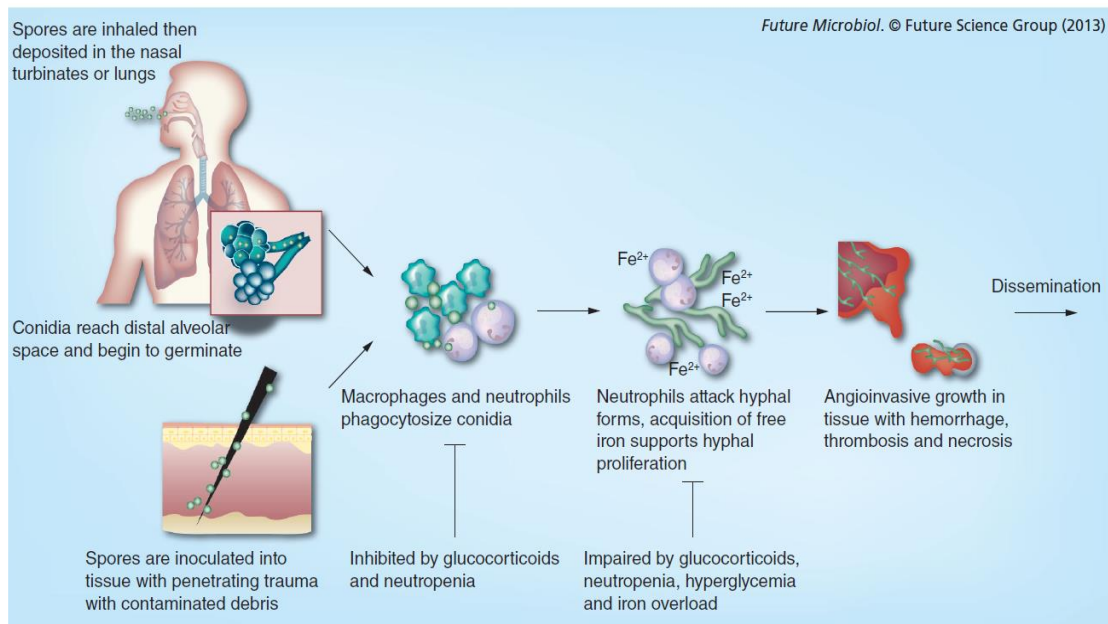
1. Ρινοεγκεφαλική
2. Πνευμονική
3. Δερματική
4. Γαστρεντερική
5. Διασπορά σε άλλα όργανα
6. Σπάνιας μορφής (Περιτονιακή, οστεομυελική)

Η πιο συχνή μορφή Μουκορμύκωσης είναι η ρινοεγκεφαλική ενώ η πνευμονική μορφή είναι η δεύτερη συχνότερη μορφή.

Όπως περιεγράφηκε παραπάνω και με τη διηθητική ασπεργίλλωση, τα κονίδια του μύκητα εισέρχονται στον οργανισμό του ξενιστή είτε μέσω επιδερμικού τραύματος είτε από τη ρινική κοιλότητα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**. Η δημιουργία λοίμωξης προϋποθέτει την αποφυγή εξουδετέρωσης των κονιδίων από τα ιστικά φαγοκύτταρα, που μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε περιοχές που έχουν υποστεί βλάβη, και την ανάπτυξη υφών που μέσω της διήθησης στο κυκλοφορικό προσβάλλουν και άλλα όργανα του ξενιστή<sup>12</sup>.

Ως εκ τούτου, οι πιο συχνές υποκείμενες συνθήκες για εγκαθίδρυση λοίμωξης είναι ασθένειες που σχετίζονται με διαταραχή ή ανεπάρκεια της λειτουργίας των φαγοκυττάρων.





**Εικόνα 4. Παθογένεση της Μουκορμύκωσης.<sup>12</sup>**

Η γνώση των βασικών παραγόντων μολυσματικότητας των μυκητών του γένους *Mucorales* είναι ελλιπής. Ωστόσο, τα διάφορα χαρακτηριστικά του μύκητα που συμβάλλουν στην επιθετική του ανάπτυξη στους ασθενείς μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω<sup>13</sup>:

- Έμφυτη θερμοαντοχή
- Ταχεία ανάπτυξη και αναμόρφωση κυτταρικού τοιχώματος
- Αντοχή σε εχθρικά περιβάλλοντα
- Δέσμευση ελεύθερου σιδήρου ή απελευθέρωση του σιδήρου της αιμοσφαιρίνης μέσω της λειτουργίας της αίμο οξυγενάσης

Με βάση τα προαναφερθέντα μπορεί να γίνει κατανοητό πως οι άνθρωποι που νοσούν από την ασθένεια αυτή έχουν κάποιο βαθμό ανοσοκαταστολής που προκύπτει από κάποιο υποκείμενο νόσημα<sup>11,14</sup> με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι

μηχανισμοί άμυνας έναντι του παθογόνου μύκητα αυτού. Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της ασθένειας αυτής είναι οι εξής:

1. Διαβητική Κετοοξέωση
2. Ουδετεροπενία
3. Αιματολογικές Κακοήθειες
4. Θεραπεία με Δεφεροξαμίνη

#### 1.4.4 Άμυνα του Οργανισμού Κατά της Μουκορμύκωσης

Τα φαγοκύτταρα είναι η κύρια γραμμή άμυνας έναντι της Μουκορμύκωσης. Η εισπνοή σπόρων *Mucorales* από ανοσοεπαρκείς ξενιστές δεν έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ασθένειας. Αντίθετα, οι ουδετεροπενικοί ξενιστές διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο. Επιπλέον, τα κορτικοστεροειδή και ο διαβήτης, είναι γνωστό ότι καταστέλλουν τις λειτουργίες των φαγοκυττάρων, προκαλώντας με την εισπνοή κονιδίων *Rhizopus oryzae* προοδευτική πνευμονική και αιματογενώς διαδεδομένη λοίμωξη<sup>14</sup>.

Τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι φαγοκύτταρα που αποτελούν την πρώτη γραμμή απόκρισης του οργανισμού στην εισβολή ενός παθογόνου μικροοργανισμού. Τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα μπορούν να φαγοκυτταρώσουν και να σκοτώσουν κόνidia μυκήτων εκκρίνοντας αντιμικροβιακά πεπτίδια και άλλα συστατικά που στερούν θρεπτικά υλικά απαραίτητα για την επιβίωση του παθογόνου<sup>15</sup>. Σε περίπτωση που κάποια κόνidia δεν έχουν φαγοκυταρωθεί και έχουν αναπτύξει υφές, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα αναλαμβάνουν την καταστροφή ή τον περιορισμό τους.

### 1.4.5 Ο Ρόλος του Σιδήρου στη Μουκορμύκωση

#### 1.4.5.1 Εξωκυττάρια Ανάπτυξη

Ο σίδηρος απαιτείται από σχεδόν όλους τους παθογόνους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξη και μολυσματικότητά τους. Στους ξενιστές, πολύ μικρή συγκέντρωση σιδήρου είναι διαθέσιμη στον ορό καθώς ως επί το πλείστον ο σίδηρος βρίσκεται προσδεμένος σε πρωτεΐνες όπως η τρανσφερίνη . Η δέσμευση σιδήρου από τον ορό είναι ένας κύριος αμυντικός μηχανισμός του ξενιστή έναντι του *Rhizopus oryzae*<sup>16</sup>. Η ανάπτυξη του μύκητα αυτού στον ορό αναστέλλεται μερικώς, ενώ η αναστολή αυτή αντιστρέφεται με εξωγενή προσθήκη σιδήρου. Η ύπαρξη περίσσειας σιδήρου ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου και τη δημιουργία εκτεταμένης λοίμωξης.

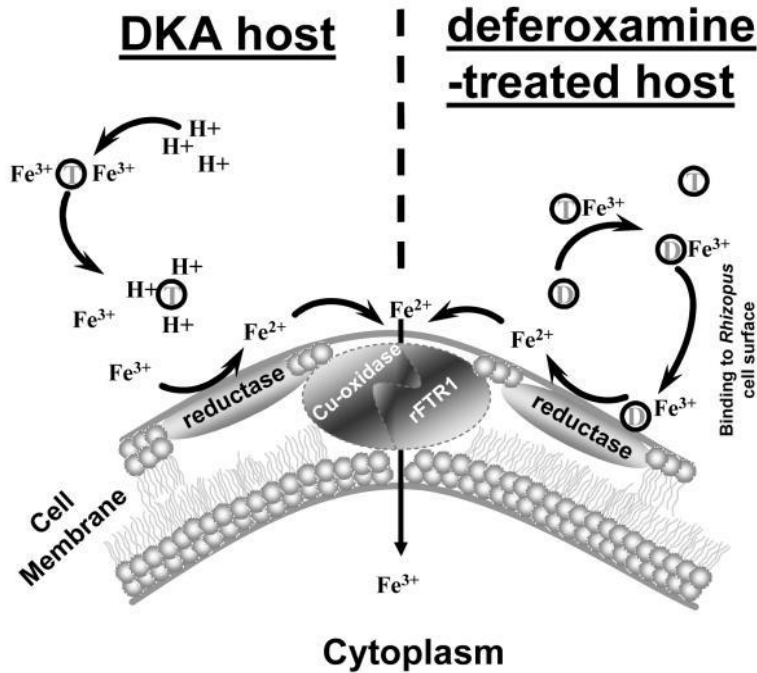
Για παράδειγμα, οι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με χηλικό παράγοντα σιδήρου, τη δεφεροξαμίνη, έχουν σημαντικά αυξημένη συχνότητα διηθητικής λοίμωξης, η οποία σχετίζεται με θνησιμότητα > 80% σε αυτούς τους ασθενείς . Ενώ η δεφεροξαμίνη δρα ως χηλικός παράγοντας σιδήρου σε σχέση με τον ανθρώπινο ξενιστή δεσμεύοντας και απομακρύνοντας περίσσεια σιδήρου, η επίδρασή της στον *Rhizopus oryzae* είναι ακριβώς η αντίθετη. Η δεφεροξαμίνη προδιαθέτει τους ασθενείς σε λοίμωξη από *Rhizopus* ενεργώντας ως σιδερόφορο, το οποίο παρέχει προηγουμένως μη διαθέσιμο σίδηρο στον μύκητα.

Ο μύκητας λαμβάνει σίδηρο από το σύμπλοκο σιδήρου-δεφεροξαμίνης με ενδοκυτταρική μεταφορά του σιδήρου χωρίς εσωτερικοποίηση της δεφεροξαμίνης. Αυτή η μεταφορά διευκολύνεται από αναγωγάσες και περμεάσες σιδήρου υψηλής συγγένειας που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5**.

Οι ασθενείς με διαβητική κετοξέωση έχει παρατηρηθεί πως έχουν αυξημένα επίπεδα διαθέσιμου σιδήρου στον ορό, πιθανώς λόγω απελευθέρωσης σιδήρου από πρωτεΐνες πρόσδεσης παρουσία οξέωσης<sup>14</sup> . Οροί που συλλέχθηκαν από ασθενείς με διαβητική κετοξέωση υποστήριξαν την ανάπτυξη του *Rhizopus oryzae* παρουσία

όξινου για τον οργανισμό pH (7,3-6,88) αλλά όχι παρουσία αλκαλικού pH (7,78-8,38). Επιπλέον, η προσθήκη εξωγενούς σιδήρου σε ορούς επέτρεψε την ανάπτυξη του *Rhizopus oryzae* σε όξινες συνθήκες αλλά όχι σε pH  $\geq 7,4$ .

Με βάση τα παραπάνω, προτάθηκε ένας μηχανισμός αφομοίωσης του σιδήρου από το παθογόνο σε καταστάσεις οξέωσης του ξενιστή. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό



(Εικόνα 5) η μείωση του pH του αίματος οδηγεί σε πρωτονίωση της τρανσφερίνης και απελευθέρωση του δεσμευμένου σιδήρου<sup>17</sup>. Επομένως, η αυξημένη ευαισθησία ασθενών με διαβητική κετοξέωση πιθανώς οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, σε αύξηση του διαθέσιμου σιδήρου στον ορό κατά τη

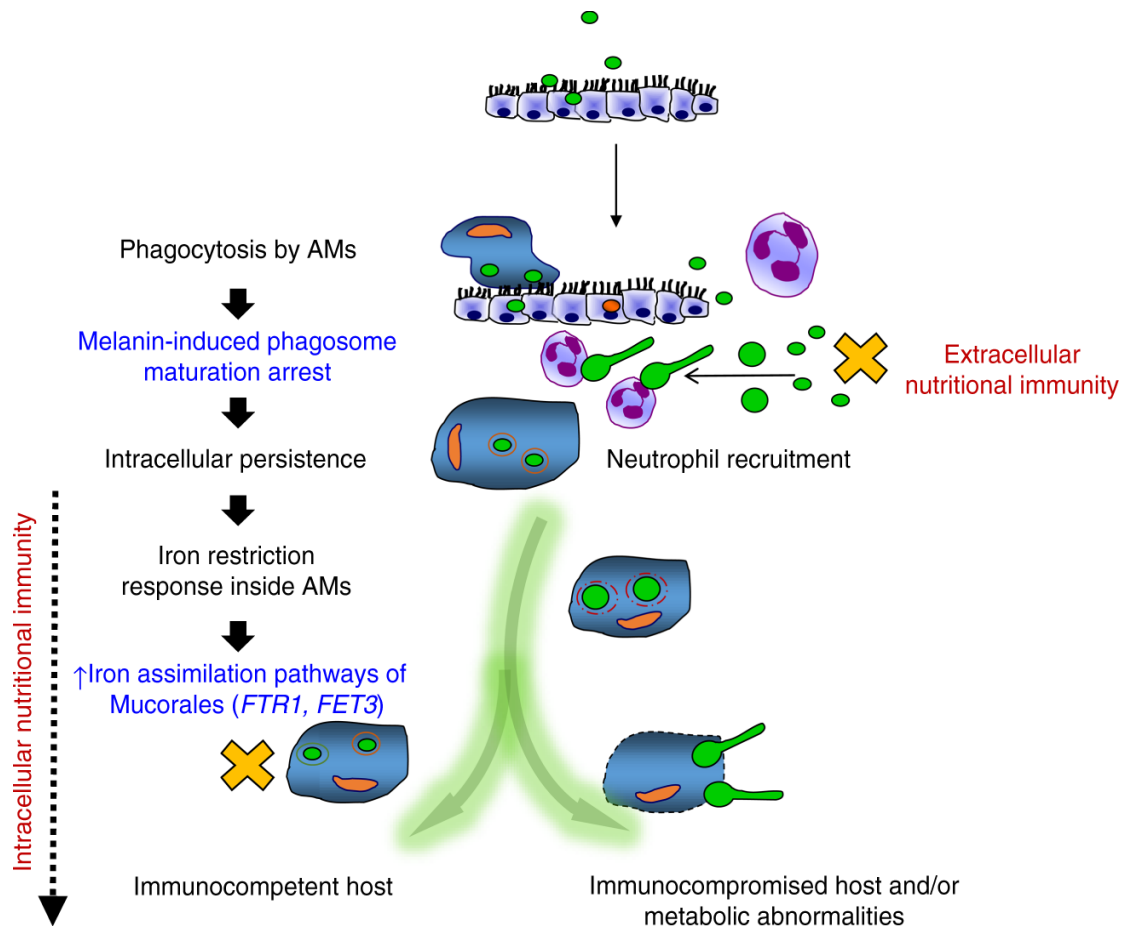
**Εικόνα 5. Προτεινόμενοι μηχανισμοί αφομοίωσης σιδήρου από Ζυγομυκήτες σε συνθήκες αυξημένου διαθέσιμου σιδήρου στον ορό. Ο όρος D χρησιμοποιείται για τη Δεφεροξαμίνη και ο όρος T για την Τρανσφερίνη<sup>17</sup>.**

διάρκεια της διαβητικής κετοξέωσης, λόγω της απελευθέρωσης του σιδήρου από την τρανσφερίνη<sup>17</sup>. Είναι σημαντικό ότι οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα διαθέσιμου σιδήρου στον ορό είναι επιρρεπείς σε μόλυνση από *Rhizopus oryzae* και άλλους ζυγομυκητές, αλλά όχι σε άλλους παθογόνους μύκητες, όπως *Candida* ή *Aspergillus*.

#### 1.4.5.2 Ενδοκυττάρια Ανάπτυξη

Τα μακροφάγα κύτταρα διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στη λοίμωξη από τους μύκητες του γένους *Mucorales*. Συγκεκριμένα, μετά την εισπνοή, τα κονίδια *Mucorales* φαγοκυτταρώνονται κυρίως από κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα (AMs). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα κονίδια παραμένουν ενδοκυττάρια για πολλές ημέρες μέσα στο μακροφάγο σε λανθάνουσα κατάσταση, χωρίς να δημιουργούν εκβλαστήσεις (υφές), λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν αναστολή ωρίμανσης του φαγοσώματος μέσω της μελανίνης που τα περιβάλλει. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλουν αμυντικούς μηχανισμούς που θα οδηγούσαν στη θανάτωση τους.

Η αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα είναι ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός του ξενιστή και συμβαίνει μέσω της ενδοκυττάριας στέρσης σιδήρου από το παθογόνο, μηχανισμό γνωστό ως *nutritional immunity*, σε ανοσοεπαρκείς ξενιστές. Ο σίδηρος όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαδραματίζει καίριο ρόλο στην παθογένεση της Μουκορμύκωσης αποτελώντας ένα μέταλλο απαραίτητο για την ανάπτυξη του ενδοκυττάρια μύκητα *Rhizopus*. Τα μακροφάγα κύτταρα κατά τη μόλυνση τροποποιούν το μεταγραφικό τους προφίλ με σκοπό να περιορίζεται η εισαγωγή σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων που αποτελεί θρεπτικό στοιχείο για το μύκητα. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε απορρύθμιση, λόγω μεταβολικών διαταραχών, που καταλήγει σε συνθήκες περίσσειας σιδήρου έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη διαθεσιμότητα σιδήρου στο παθογόνο, γεγονός που οδηγεί σε ανάπτυξη και εκβλάστηση ενδοκυτταρικών μυκητιακών κονιδίων και πρόκληση διηθητικής ασθένειας<sup>18</sup> (**Εικόνα 6**).



**Εικόνα 6.** Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα περισσότερα κονίδια *R. oryzae*, τα οποία παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση εντός των φαγοσωμάτων. Η ικανότητά τους να παραμένουν στο εσωτερικό των φαγοσωμάτων οφείλεται στην αναστολή της ωρίμανσης των φαγοσωμάτων που προκαλείται από τη μελανίνη. Από την άλλη πλευρά, ο ξενιστής μέσω του περιορισμού του διαθέσιμου σιδήρου αμύνεται έναντι στο παθογόνο<sup>18</sup>.

#### 1.4.6 Ο Ρόλος του Σιδήρου στα Βιολογικά Συστήματα

Ο σίδηρος αποτελεί το μέταλλο με σύμβολο Fe, ατομικό αριθμό 26 και ατομική μάζα 55,847. Ανήκει στην κατηγορία των στοιχείων μετάπτωσης και πιο συγκεκριμένα στην ομάδα 8 του περιοδικού πίνακα. Μπορεί να βρεθεί σε δύο οξειδωτικές καταστάσεις, τον τρισθενή ( $Fe^{3+}$ ) και το δισθενή ( $Fe^{2+}$ ) σίδηρο.

Ο σίδηρος βρίσκεται σε αφθονία στην επιφάνεια της γης κυρίως με τη μορφή οξειδίων του σιδήρου<sup>19</sup>. Επιπλέον, αποτελεί βασικό στοιχείο όλων των έμβιων όντων για την επίτευξη σημαντικών διεργασιών των κυττάρων όπως:

- i. Παραγωγή ATP
- ii. Σύνθεση και επιδιόρθωση DNA
- iii. Μεταφορά οξυγόνου

Στον ανθρώπινο οργανισμό ο σίδηρος μπορεί να βρεθεί είτε προσδεμένος σε πρωτεΐνες, όπως η τρανσφερίνη, για τη μεταφορά του μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο υπόλοιπο σώμα, είτε σε πρωτεΐνες αποθήκευσης όπως η φερριτίνη. Ένα μεγάλο ποσοστό του σιδήρου μπορεί να βρεθεί και σε μόρια αίμης αλλά και σε σύμπλοκα σιδήρου – θείου.

Με την είσοδό του στα κύτταρα, ο σίδηρος διαχέεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και σε άλλα οργανίδια όπως τα λυσοσώματα. Σε όλες αυτές τις κυτταρικές δομές αποθηκεύεται είτε χρησιμοποιείται στην τρισθενή του μορφή ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ωστόσο, υπάρχει διαθέσιμη μικρή συγκέντρωση ελεύθερου δισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ) που καθίσταται επιβλαβής για τα κύτταρα μέσω αντιδράσεων παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου.

- 1)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{HO}^\cdot$
- 2)  $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^\cdot \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
- 3)  $\text{O}_2^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{HO}^\cdot$

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρούν με βιολογικά μόρια προκαλώντας βλάβες στο DNA, σε πρωτεΐνες αλλά και λιπίδια οδηγώντας ορισμένες φορές σε κυτταρικό θάνατο<sup>20</sup>.

Η συσσώρευση σιδήρου έχει συσχετιστεί με αρκετές ασθένειες όπως ο καρκίνος, καρδιομυοπάθειες αλλά και με νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος Parkinson. Ο χαρακτηρισμός και η ποσοτικοποίηση της μορφής του σιδήρου στον οργανισμό μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς ανάπτυξης ασθενειών όπως οι παραπάνω.

## 1.5 Χαρακτηρισμός Ειδών Μετάλλων

Τα μέταλλα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα και στην εύρυθμη λειτουργία οικοσυστημάτων. Κάποια στοιχεία είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές και φυσιολογικές δραστηριότητες των οργανισμών, άλλα είναι τοξικά για ορισμένους οργανισμούς, άλλα θεωρούνται απαραίτητα και άλλα ανάλογα με τη συγκέντρωση μπορεί να είναι είτε ευεργετικά είτε τοξικά<sup>21</sup>. Για παράδειγμα, τα ιόντα Cr(VI) θεωρούνται πολύ πιο τοξικά από τα ιόντα Cr(III), ενώ η μεθυλιωμένη μορφή υδραργύρου σε σχέση με την ανόργανη μορφή παρουσιάζει αυξημένη τοξικότητα<sup>22</sup>.

Η διατήρηση της συγκέντρωσης των μετάλλων στον οργανισμό σε ρυθμιζόμενα επίπεδα, όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό από τα προαναφερθέντα είναι μείζονος σημασίας. Η κατανόηση του μηχανισμού βιοσυσσώρευσης μετάλλων αλλά και της βιοδιαθεσιμότητας αυτών μπορεί να επιτευχθεί με τη μελέτη ειδοταυτοποίησης των στοιχείων. Είναι απαραίτητη επομένως η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για το διαχωρισμό, χαρακτηρισμό αλλά και ποσοτικοποίηση των εκάστοτε μορφών των μετάλλων.

Με την ενασχόληση και την έρευνα ήδη από τη δεκαετία του 1970 με τις διαφορετικές μορφές των μετάλλων παρουσιάστηκε η ανάγκη εισαγωγής νέων ορισμών για τις μελέτες αυτές<sup>23</sup>:

- i. **Χημικά είδη (Chemical Species):** Ο όρος αυτός αναφέρεται σε μία συγκεκριμένη μορφή ενός στοιχείου όσον αφορά στην ισοτοπική του σύσταση, στην ηλεκτρονιακή ή οξειδωτική του κατάσταση, στην μοριακή του δομή ή συμμετοχή σε σύμπλοκα.
- ii. **Ανάλυση χημικών ειδών (Speciation analysis):** Ο όρος αυτός αναφέρεται στις αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των διαφορετικών χημικών ειδών σε ένα δείγμα.



- iii. **Χαρακτηρισμός ειδών στοιχείου (Speciation of an element):** Ο όρος αυτός αναφέρεται στην κατανομή ενός στοιχείου στα διαφορετικά χημικά είδη του σε ένα δείγμα.

### *1.5.1 Υπάρχουσες Τεχνικές Ειδοταυτοποίησης Σιδήρου σε Βιολογικά Δείγματα*

Η ειδοταυτοποίηση των μετάλλων σε βιολογικά δείγματα έχει αποτελέσει ένα ερευνητικό πεδίο στο οποίο έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανάπτυξης αναλυτικών μεθόδων ανά τα χρόνια. Από τα ήδη υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα η αναλυτική πορεία που ακολουθείται για την επίτευξη του προσδιορισμού αυτού συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα.

- 1. Απόκτηση βιολογικού δείγματος** (μητρικό γάλα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, εγκεφαλικά κύτταρα, ορός αίματος)
- 2. Διαχωρισμός μεταλλοπρωτεϊνών και άλλων ειδών μετάλλων**
- 3. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση μετάλλων**

Μετά την απόκτηση των βιολογικών δειγμάτων είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των διαφορετικών ειδών των προς ανάλυση μετάλλων. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας, όπως χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού<sup>24-27</sup> (SEC) , ιοντική χρωματογραφία<sup>28,29</sup> (IC) αλλά και η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές σωλήνα<sup>30,31</sup> (CE).

Οι παραπάνω τεχνικές είναι συμβατές με αρκετές μορφές φασματομετρίας μάζας με κύρια μορφή το ICP-MS, τα πλεονεκτήματα του οποίου θα συζητηθούν παρακάτω.

Άλλες μορφές φασματομετρίας μάζας που έχουν συζητηθεί με τις παραπάνω τεχνικές διαχωρισμού είναι και η τεχνική LA-ICP-MS (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) όπως και η τεχνική AAS (Atomic Absorption Spectroscopy), ωστόσο η εφαρμογή της πρώτης είναι περιορισμένη λόγω της

καταστροφής του δείγματος αλλά και των έντονων φαινομένων μήτρας ενώ τα μειονεκτήματα της δεύτερης είναι τα μεγαλύτερα όρια ανίχνευσης και η μονοστοιχειακή ανάλυση.

Για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βαθμίδας του σιδήρου σε εκχυλίσματα φυτών έχει χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος X-ray spectroscopy<sup>32</sup>, ωστόσο η τεχνική αυτή περιορίζεται σε γνωστές ενώσεις και σταθερά σύμπλοκα, καθώς και υψηλή συγκέντρωση ιόντων.

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Οργανολογία – Εργαστηριακός εξοπλισμός

- NexION 300X ICP-MS με χρήση του λογισμικού Syngistix, *Perkin Elmer*
- LC-20AD gradient pump, *Shimadzu*
- Switching Valve EV700-100, *Rheodyne*
- Στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού Hitrap Desalting 5 mL, *Sigma Aldrich*
- Στήλη χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων HILIC Diol 100 Å, 5μm, 2.1 x 150 mm
- Εξαρτήματα χρωματογραφίας (PEEK tubings, PEEK fittings, βρόγχος (*loop*) δείγματος 100 μL και 12 μL)
- Σύριγγα των 500 μL, *Hamilton*

### 2.2 Αντιδραστήρια

Ανθρώπινη τρανσφερίνη, Οξικό αμμώνιο (Sigma-Aldrich), νιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich), Ένυδρος διχλωριούχος σίδηρος  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich), ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich), Mohr's salt θειικός σίδηρος αμμωνίου  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , χλωριούχο υδροξυλαμμώνιο  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , Πυριδίνη - 2, 6 – δικαρβοξυλικό οξύ (PDCA) (Sigma-Aldrich),, θειικό κάλιο, υδροξείδιο του

καλίου, μεθανικό οξύ. Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων σιδήρων έγινε με υπερκάθαρο νερό σε συγκέντρωση 100 ppm και οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν στην εκάστοτε κινητή φάση. Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος της τρανσφερίνης έγινε σε διάλυμα οξικού αμμωνίου 0,05 M.

## 2.3 Μέθοδοι

### Παρασκευή YAG plates

Για 300 mL διάλυμα ζυγίζονται :

- 1,5 gr yeast extract
- 4,5 gr agar

Και αναμειγνύονται σε γυάλινη φιάλη με 200 mL απιονισμένο νερό. Στο ίδιο σκεύος προστίθενται :

- 300 μL trace elements
- 600 μL Vitamin mix
- 3 mL MgSO<sub>4</sub>

Σε διαφορετική γυάλινη φιάλη ζυγίζονται 3 gr δεξτρόζη και διαλύονται σε 100 mL απιοντισμένο νερό. Ακολουθεί αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121°C για 15 λεπτά σε ξεχωριστά δοχεία προκειμένου να μην αλλοιωθεί η δεξτρόζη. Το υλικό τοποθετείται σε petri plates, αφήνεται να στερεοποιηθεί και φυλάσσεται στον ψυκτικό θάλαμο μέχρι τη χρήση.

### Παρασκευή Conditioned Medium

Για 150 mL Conditioned Medium αναμειγνύονται:

- 75 mL DMEM Glutamax
- 30 mL FBS 10%
- 45 mL L929 sup-MCSF
- 1 mL Penicillin/Streptomycin 100 mM
- 1 mL sodium pyruvate 100mM

Το διάλυμα περνάει από φίλτρο 0,20 μm και τοποθετείται σε σωληνάρια των 50 mL.

### **Παρασκευή DMEM Glutamax Complete**

Για 500 mL DMEM Glutamax Complete αναμειγνύονται:

- 450 mL DMEM Glutamax (Thermo Fisher, cat#10569010)
- 50 mL FBS 10%
- 1 mL sodium pyruvate 100mM
- 1 mL Penicillin/Streptomycin 100 mM

### **Μικροοργανισμοί και συνθήκες καλλιέργειας**

Το στέλεχος *Rhizopus* που χρησιμοποιήθηκε (WT *R. delemar* 99880) καλλιεργήθηκε σε Yeast extract agar glucose agar plates για 3 μέρες στους 37 °C. Στη συνέχεια, από την καλλιέργεια αυτή ανακτάται διάλυμα του μύκητα με PBS 1X και χρήση γυάλινης ράβδου. Το διάλυμα περνάει από φίλτρο 40 μm και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 5000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 10 mL PBS και φυγοκεντρείται ξανά. Το προκύπτον ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με PBS σε όγκο 1mL και 10μL από αυτό τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer για τη μέτρηση των κονιδίων σε μικροσκόπιο.

### **Εγκαθίδρυση Διαβητικής κετοξέωσης**

Αρσενικοί ποντικοί 8-12 εβδομάδων C57BL/6 χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη δόση streptozotocin που θα τους χορηγούνταν (150-200 mg/kg streptozotocin) για την ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης. Σε κάθε ομάδα τοποθετήθηκαν ποντικοί με διαφορά βάρους έως 1 gr. Προτού γίνει η χορήγηση του φαρμάκου, απομακρύνθηκε μόνο η τροφή από τα κλουβιά των ποντικών για 7-8 ώρες. . Ανάλογα με το βάρος των ποντικών ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα φαρμάκου (streptozotocin) (Sigma-Aldrich, cat#18883-66-4) και στη συνέχεια διαλυτοποιείται σε διάλυμα που περιέχει 0.1 M κιτρικό οξύ και 0.2 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο (pH 4.2). Μετά το πέρας των 7-8 ωρών έγινε χορήγηση του φαρμάκου ενδοπεριτονιακά σε ποσότητα 100 μL. Η διαβητική κετοξέωση επιτυγχάνεται 7-10 μέρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Ο έλεγχος για την κετοξέωση πραγματοποιείται , 7 μέρες μετά τη χορήγηση του

φαρμάκου, με τη χρήση ταινιών ανάλυσης ούρων Keto-Diastix, η γλυκόζη στο αίμα των ποντικών ποσοτικοποιείται με τη χρήση μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης.

### **Απομόνωση κυψελιδικών μακροφάγων ποντικών μολυσμένων με *Rhizopus delemar***

C57BL/6 και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικοί διατηρήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες (24 °C, 12/12-ώρες φως/σκοτάδι), σε ειδικές στείρες εγκαταστάσεις, έχοντας πλήρη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Αρσενικοί ποντικοί, φυσιολογικοί και διαβητικοί οξεωτικοί, 8-12 εβδομάδων ( C57BL/6 ) μολύνθηκαν ενδοτραχειακά με  $2 \times 10^6$  κονίδια του μύκητα *Rhizopus delemar*. Εν συνεχεία, έξι ώρες μετά τη μόλυνση, έγινε ευθανασία των ποντικών και συλλέχθηκαν κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα. Κατά τη διαδικασία αυτή, με μία σύριγγα 1 mL πραγματοποιείται έγχυση PBS χωρίς Ca, Mg, με προσθήκη EDTA 10 mM (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα), μέσω της τραχείας του ποντικού στον πνεύμονα και συλλέγεται το βρογχοκυψελιδικό υγρό. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό φυγοκεντρείται στα 400 g για 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε DMEM Glutamax (10% FBS, 20% L929 sup, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM Penicillin/Streptomycin) και η συγκέντρωση των κυττάρων προσδιορίζεται με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε καλυπτρίδες που έχουν υποστεί επεξεργασία με 0,01% poly-L-lysine σε αριθμό 200.000 ανά καλυπτρίδα.

Για τα πειράματα όπου απομονώθηκαν κυψελιδικά μακροφάγα πνεύμονα από υγιείς STEAP4<sup>-/-</sup> και C57BL/6 ποντικούς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν με Iron Dextran 5, 10 mM για 24 ώρες και μολύνθηκαν με το μύκητα *Rhizopus delemar* σε αναλογία 1:5 (κονίδια μύκητα : κύτταρα) για 7 ώρες.

### **Απομόνωση μυελού των οστών ποντικών και διαφοροποίηση σε μακροφάγα**

Wild type C57BL/6 και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικοί χρησιμοποιούνται για απομόνωση κνήμης και μηρού. Τα οστά τοποθετούνται σε HBSS (Hanks Balanced Salts). Η λαβίδα και το

ψαλίδι που θα χρησιμοποιηθούν απολυμαίνονται με αιθανόλη 70% και φλόγα. Κόβονται οι δύο άκρες από το κάθε οστό και με σύριγγα που περιέχει 20 mL Conditioned Medium με 1μL amphotericin B (5mg/mL) πραγματοποιείται η απομόνωση του μυελού. Προκειμένου να γίνει πλήρης διαλυτοποίηση και να μην υπάρχουν συσσωματώματα γίνεται ανάδευση με τη σύριγγα. Το διάλυμα που έχει προκύψει προστίθεται σε φλάσκα T-75 κατάλληλη για καλλιέργεια κυττάρων και τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 6 ημέρες. Στις 4 ημέρες γίνεται ανανέωση του Conditioned Medium με προσθήκη 5 mL αυτού. Μετά το πέρας των 6 ημερών το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και η φλάσκα ξεπλένεται με 10 mL HBSS. Με cell scraper και 10 mL DMEM Glutamax Complete μαζεύονται τα κύτταρα σε σωληνάριο των 15 mL. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο διάλυμα προσδιορίζεται με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου.

#### **Επώαση μακροφάγων κυττάρων μυελού των οστών με εξωγενείς πηγές σιδήρου και DFO και επιμόλυνση με το μύκητα *Rhizopus delemar***

Σε 24-well plate τοποθετείται ο επιθυμητός αριθμός καλυπτρίδων που έχουν υποστεί επεξεργασία με 0,01% poly-L-lysine. Σε αυτά, τοποθετούνται σε σταγόνα (100 μL) 250.000 – 300.000 κύτταρα και αφήνονται στον επωαστικό θάλαμο των 37°C για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα προκειμένου το κάθε πηγάδι να περιέχει 1mL DMEM Glutamax Complete. Τα κύτταρα αφήνονται να απλώσουν για περίπου μία ώρα. Αφού περάσει 1 ώρα, πραγματοποιείται η επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με FeCl<sub>3</sub> 300 μM, Iron Dextran 10,20,40 mM, Ferric Ammonium Citrate 300 μM και DFO (Deferoxamine mesylate) 300 μM. Το 24-well plate αφήνεται για 24 ώρες στον επωαστικό θάλαμο των 37°C. Μετά από 24 ώρες γίνεται επιμόλυνση των κυττάρων με τον μύκητα *Rhizopus delemar* σε αναλογία 1:5 κόνιδια προς κύτταρα. Υπολογίζεται η απαιτούμενη αραιώση από το stock του μύκητα και γίνεται η επιμόλυνση των μακροφάγων με την κατάλληλη ποσότητα. Αφήνονται τα κύτταρα να φαγοκυτταρώσουν για περίπου 2 ώρες και στη συνέχεια γίνονται εκπλύσεις με 500 μL HBSS 5 φορές για την απομάκρυνση κονιδίων που δεν

έχουν φαγοκυτταρωθεί. Προστίθενται εκ νέου οι απαραίτητες ποσότητες σιδήρου και DFO και τα κύτταρα αφήνονται στον κλίβανο για 16 περίπου ώρες.

Σε όλα τα πειράματα όπου έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση της διαμέτρου των κονιδίων του μύκητα, εικόνες των κυττάρων λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP8.

### **Μονιμοποίηση κυττάρων**

Μετά από 16 ώρες γίνονται εκπλύσεις με 500  $\mu$ L PBS 1X. Από διάλυμα φορμαλδεΐδης 37% παρασκευάζεται με PBS 1X διάλυμα 4%. Από αυτό προστίθενται 500  $\mu$ L για 15 λεπτά σε κάθε πηγάδι για να γίνει η μονιμοποίηση. Ύστερα, ξεπλένονται 2 φορές με 500  $\mu$ L PBS 1X και ακολουθεί η διαδικασία του ανοσοφθορισμού.

### **Ανοσοφθορισμός μακροφάγων κυττάρων**

#### Χρώση Κυττάρων με Propidium Iodide

Η χρώση των κυττάρων με τη φθορίζουσα χρωστική propidium iodide γίνεται μέσω της πρόσδεσής της στη διπλά έλικα του DNA των κυττάρων που έχουν γίνει διαπερατές οι μεμβράνες τους με τη χρήση της φορμαλδεΐδης. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προστίθενται 500  $\mu$ L propidium iodide 1:500 σε 1X PBS για 15 λεπτά (διέγερση: 535 nm και εκπομπή: 617 nm). Στη συνέχεια, το πηγάδι ξεπλένεται δύο φορές με 500  $\mu$ L PBS 1X.

#### Χρώση Κυττάρων με Rhodamine Phalloidin

Η rhalloidin είναι ένα εξαιρετικά εκλεκτικό πεπτιδίο που χρησιμοποιείται για τη χρώση νηματοειδούς ακτίνης (F-ακτίνη) σε κύτταρα όταν οι μεμβράνες τους έχουν γίνει διαπερατές με τη χρήση φορμαλδεΐδης. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προστίθενται 500  $\mu$ L rhodamine phalloidin 1:1000 σε 1X PBS για 40 λεπτά (διέγερση: 545 nm και εκπομπή: 565 nm). Στη συνέχεια, το πηγάδι ξεπλένεται δύο φορές με 500  $\mu$ L PBS 1X.

### ***Rhizopus delemar* Calcofluor white staining**

Για τη σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα *Rhizopus delemar* χρησιμοποιήθηκε η χρωστική fluorescent brightener 28 (Sigma-aldrich, cat#F3543). Κονίδια του μύκητα συγκέντρωσης  $2 \times 10^7$ /mL επώαστηκαν με 500  $\mu$ g/mL της χρωστικής για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση σε όξινο ανθρακικό νάτριο. Έπειτα, τα κονίδια του μύκητα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 3.500 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Προστέθηκε 1X PBS και ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου για την απομάκρυνση τυχόν περίσσειας της χρωστικής. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές και στο τέλος τα κονίδια του μύκητα διαλυτοποιήθηκαν σε 1X PBS και αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

### **Προετοιμασία κυττάρων για μέτρηση ολικού σιδήρου με τη μέθοδο ICP-MS**

Σε 12-well plate τοποθετούνται 100.000, 500.000, 1.000.000, 2.000.000 κύτταρα στον επωαστικό θάλαμο 37°C για περίπου 1 ώρα. Στις συνθήκες όπου απαιτείται υπερφόρτωση σιδήρου προστίθενται 50  $\mu$ L από διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  6mM που παρασκευάστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω, για τελική συγκέντρωση 300  $\mu$ M. Στις συνθήκες όπου απαιτείται υπερφόρτωση σιδήρου και Deferoxamine προστίθενται 50 $\mu$ L  $\text{FeCl}_3$  6mM και 50 $\mu$ L DFO 6mM για τελική συγκέντρωση 300 $\mu$ M. Μετά από 24 ώρες με αποκολλούνται τα κύτταρα με cell scraper και τοποθετούνται σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 1,5 mL (Eppendorf tubes) και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 400 g. Το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται ενώ το ίζημα που αποτελείται από τα κύτταρα επαναδιαλύεται σε 1 mL RPMI 1640. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απομάκρυνση εκ νέου του υπερκείμενου. Τα κύτταρα σε μορφή πελέτας διατηρούνται στους -80°C έως τη μέτρησή τους.



Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στο όργανο ICP-MS, σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 mL HNO<sub>3</sub> 68% w/w για πλήρη διαλυτοποίηση. Τα erpendorf αναδεύονται για 30 δευτερόλεπτα στο vortex και στη συνέχεια τοποθετούνται για 30 λεπτά περίπου σε υδατόλουτρο υπερήχων. Πριν την ανάλυση η επεξεργασία ολοκληρώνεται με 480 mL απιονισμένου νερού για την αραιώση του HNO<sub>3</sub> σε 4%.

Για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, χρησιμοποιούνται διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε Fe<sup>3+</sup>. Πιο συγκεκριμένα:

- 10 ppb Fe<sup>3+</sup> διάλυμα σε 4% HNO<sub>3</sub>
- 50 ppb Fe<sup>3+</sup> διάλυμα σε 4% HNO<sub>3</sub>
- 100 ppb Fe<sup>3+</sup> διάλυμα σε 4% HNO<sub>3</sub>
- 500 ppb Fe<sup>3+</sup> διάλυμα σε 4% HNO<sub>3</sub>

## **2.4 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS)**

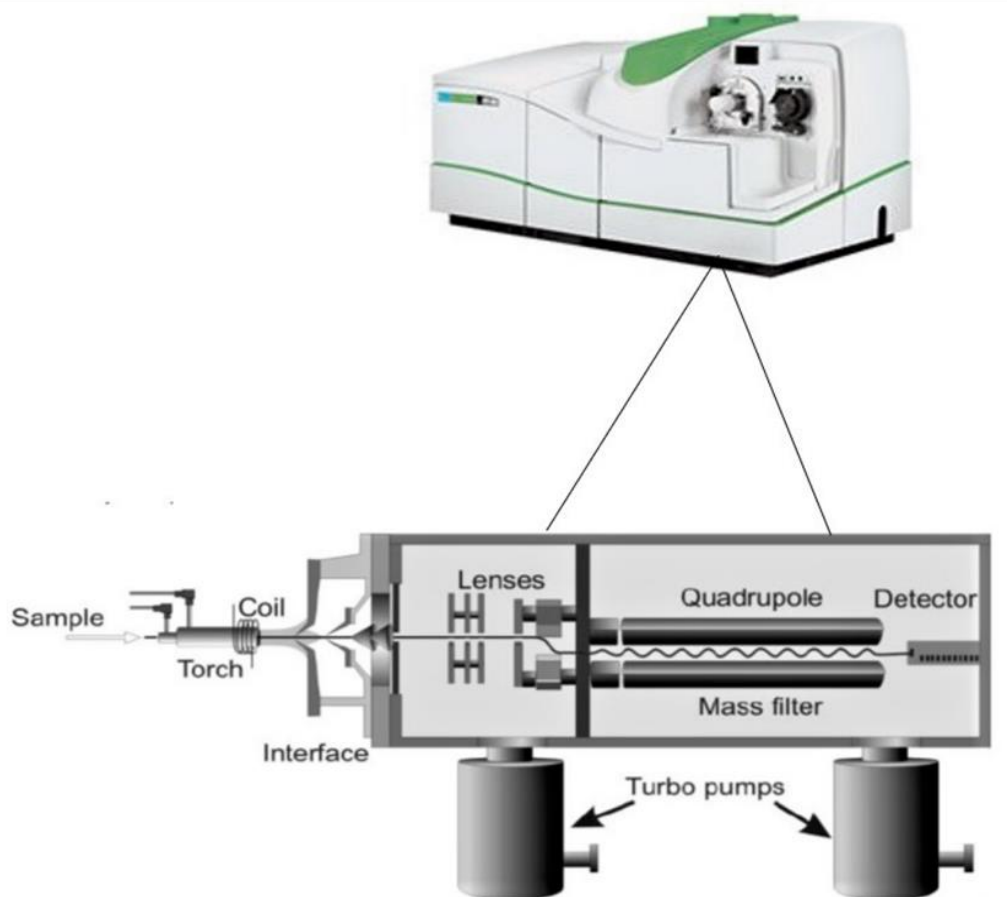
Οι πρώτες εφαρμογές της μεθόδου της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) αναφέρονται ήδη από το 1980<sup>33</sup>. Σε σύντομο χρονικό διάστημα η τεχνική του ICP-MS εγκαθιδρύθηκε ως η μέθοδος επιλογής για την στοιχειακή ανάλυση μεγάλου εύρους δειγμάτων. Η επιλογή αυτή βασίζεται σε χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα που προσφέρει σε σχέση με άλλες μεθόδους ατομικής φασματομετρίας. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μία μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας, με δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών στοιχείων συγχρόνως. Επιπλέον, μεγάλης σημασίας είναι και η δυνατότητα παρακολούθησης και διάκρισης μεταξύ των ισότοπων ενός στοιχείου καθώς και το μεγάλο γραμμικό εύρος της μεθόδου<sup>34</sup>.

Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά έγινε και η επιλογή της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ως την καταλληλότερη μέθοδο για τον προσδιορισμό του δεσμευμένου σε πρωτεΐνες σιδήρου καθώς και άλλων ειδών σιδήρου.

Το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται με σκοπό τον προσδιορισμό του δεσμευμένου σε πρωτεΐνες σιδήρου καθώς και διαφόρων άλλων ειδών σιδήρου που έχουν διαχωριστεί είναι το φασματόμετρο μάζας NexION 350X ICP-MS, το οποίο λειτουργεί με χρήση του λογισμικού *Syngistix*, της εταιρείας *Perkin Elmer*. Υπάρχουν έξι θεμελιώδη τμήματα σε ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος<sup>35</sup>:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Επαγωγικά συζευγμένο Πλάσμα
3. Διεπιφάνεια
4. Φακοί εστίασης ιόντων
5. Αναλυτής μάζας
6. Ανιχνευτής

Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζεται η διάταξη του συστήματος του ICP-MS και η πορεία του προς ανάλυση δείγματος και του αναλύτη στο εσωτερικό του φασματόμετρου. Τα υγρά δείγματα αρχικά φτάνουν στο θάλαμο της εκνέφωσης με τη ροή αερίου αργού (Ar), εκνεφώνονται στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δημιουργώντας ένα λεπτό αερόλυμα που μεταφέρεται στη συνέχεια στο πλάσμα του αργού. Το πλάσμα υψηλής θερμοκρασίας ιοντίζει το δείγμα, δημιουργώντας άτομα και ιόντα τα οποία στη συνέχεια εξάγονται μέσω της διεπιφάνειας σε μία σειρά ηλεκτροστατικών φακών που ονομάζονται φακοί εστίασης ιόντων. Οι φακοί ιόντων εστιάζουν και καθοδηγούν τη δέσμη ιόντων στον αναλυτή μάζας (τετράπολο). Ο αναλυτής μάζας διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) και τα ιόντα μετρούνται στον ανιχνευτή, έναν ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή.



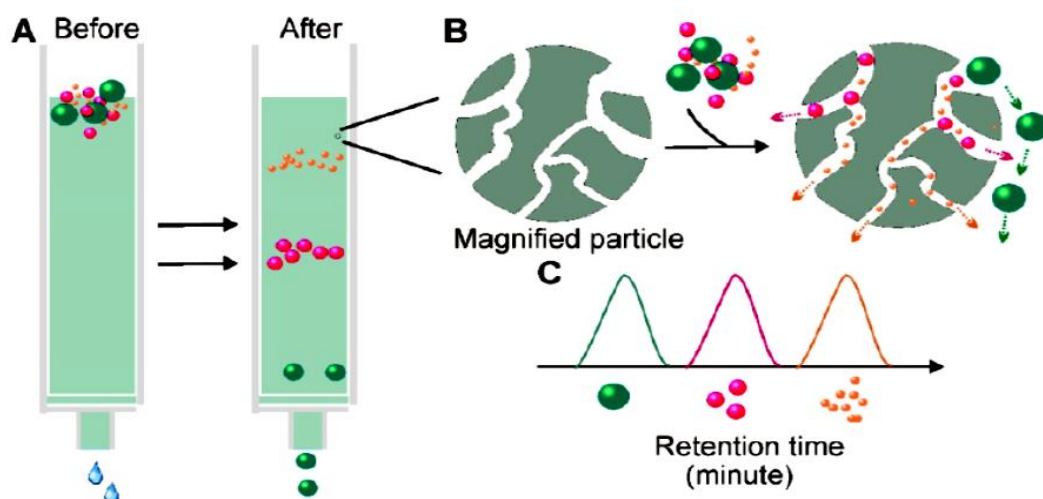
*Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση του φασματομέτρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος και των επιμέρους στοιχείων του<sup>35</sup>.*

## 2.5 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (SEC)

Ο όρος χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αναφέρεται στη διαδικασία διαχωρισμού μορίων ανάλογα με το μέγεθος και τη δομή τους, καθώς περνούν από μία πορώδη στατική φάση. Πρόκειται για υγρή χρωματογραφική τεχνική, όπου το δείγμα εισάγεται σε μία στήλη με πορώδες πληρωτικό υλικό και διαχέεται κατά μήκος της στήλης με τη βοήθεια ενός διαλύτη.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται από τη διαφορά που παρουσιάζουν οι πόροι στη διαπερατότητά τους από μόρια διαφορετικού μεγέθους. Πιο συγκεκριμένα, ο όγκος

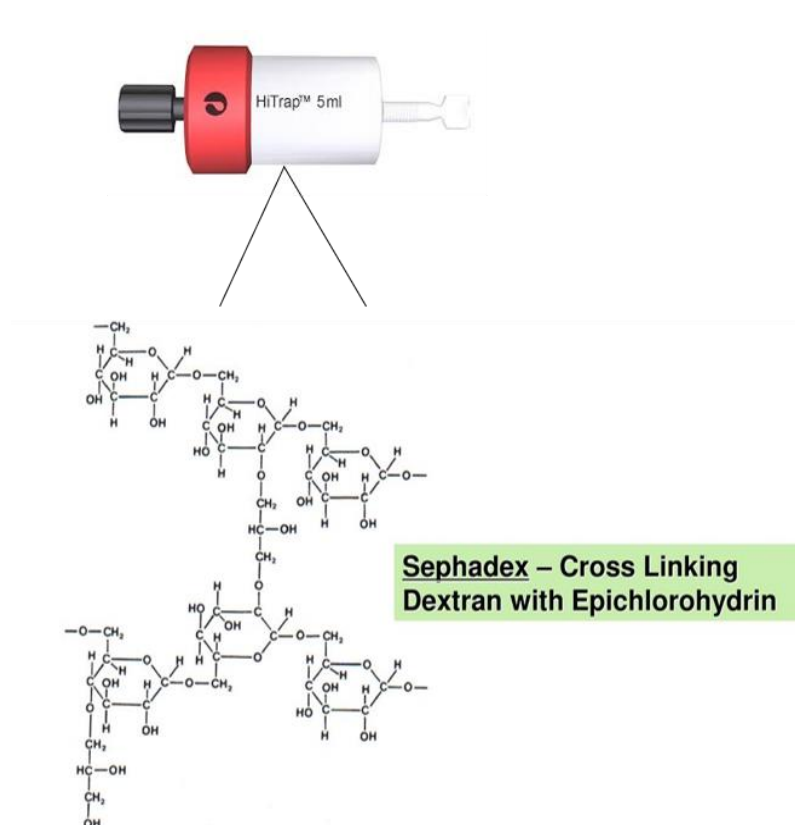
των πόρων που είναι προσβάσιμη στα μόρια είναι μεγαλύτερη για μικρότερα μόρια σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Με αυτόν τον τρόπο, τα μεγαλύτερα μόρια έχουν μικρότερο χρόνο κατακράτησης στο εσωτερικό των πόρων και εκκλύονται από τη στήλη πρώτα<sup>36,37</sup> (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Κατά τη διέλευση ενός διαλύματος μέσω μιας στατικής φάσης που αποτελείται από πορώδη σωματίδια ρητίνης, τα μόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους (A). Σωματίδια που εισέρχονται με υδροδυναμικές ακτίνες μικρότερες από αυτές των πόρων της στατικής φάσης διανύουν μεγαλύτερη απόσταση στη στατική φάση ενώ μεγαλύτερα σωματίδια, τα οποία δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους, κινούνται απευθείας γύρω από τη ρητίνη (B). Αυτό προκαλεί σωματίδια με διαφορετικά μεγέθη να παρουσιάζουν διαφορετικούς χρόνους συγκράτησης και επομένως να διευκολύνουν τον διαχωρισμό βάσει μεγέθους<sup>36</sup>.

### 2.5.1 Στήλη Χρωματογραφίας Μοριακού Αποκλεισμού - HiTrap Desalting

Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ενώσεων βάσει του μοριακού τους βάρους αποτελεί μία στήλη αφαλάτωσης (desalting). Η στατική φάση της παρούσας στήλης αποτελείται από διασυνδεδεμένα μόρια δεξτράνης με επιχλωρυδρίνη (**Εικόνα 9**). Το μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται



**Εικόνα 9.** Απεικόνιση της δομής της στατικής φάσης της στήλης μοριακού αποκλεισμού που αποτελείται από διασυνδέσεις μορίων δεξτράνης με επιχλωρυδρίνη.

της δεδομένης στήλης είναι η γρήγορη και σχετικά εύκολη διάκριση μεταξύ συστατικών του δείγματος μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους και το μεγάλο εύρος pH στα οποία λειτουργεί η στήλη (pH 2-13).

Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης, μόρια υψηλού μοριακού βάρους > 5.000 Da δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να εκλύονται ταχύτατα σε αναμενόμενο όγκο έκλουσης που αντιστοιχεί σε όγκο κινητής φάσης, κοντά στον κενό όγκο  $V_0$  (1,5 mL). Αντιθέτως, ενώσεις χαμηλού

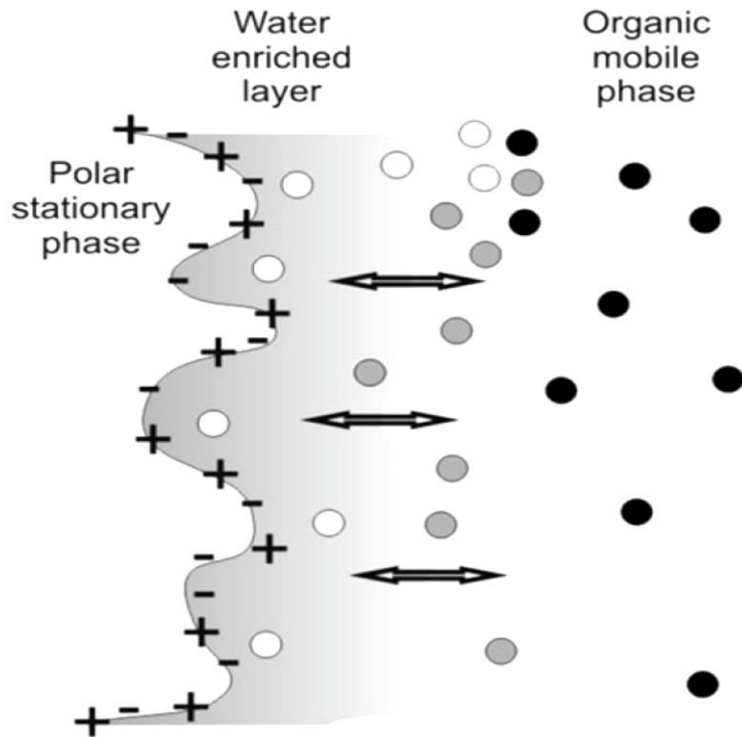
εξαρτάται από τον αριθμό των διασυνδέσεων της δεξτράνης. Στην παρούσα στήλη το μέγεθος των σωματιδίων είναι >20 μm στην στερεή μορφή και ο όγκος της στατικής φάσης 5 mL. Η πίεση στην οποία χρησιμοποιείται δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 42 psi. Το πλεονέκτημα που προσφέρει η χρήση

μοριακού βάρους < 1.000 Da εισέρχονται πλήρως στο πλέγμα της στατικής φάσης και έχουν μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της δεδομένης στήλης, η έκλυση των προαναφερθέντων ενώσεων αναμένεται να έχει ολοκληρωθεί μέχρι το πέρας του τελικού όγκου της στήλης  $V_t$  (5 mL). Ενώσεις με μοριακό βάρος μεταξύ 1.000-5.000 δεν εισέρχονται πλήρως στους πόρους της στατικής φάσης και δεν κατακρατούνται τόσο ισχυρά, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να είναι αρκετά αποδοτικός. Η έκλυσή τους συνεπώς προηγείται των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (<1.000 Da). Η περιοχή 1.000-5.000 καλείται περιοχή κλασματώσεως της στήλης<sup>38</sup>.

## 2.6 Χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC)

Η χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων συνδυάζει χαρακτηριστικά χρωματογραφίας κανονικής φάσης (πολική στατική φάση), αντίστροφης φάσης (πολική κινητή φάση) και ιοντοανταλλακτικής φάσης. Η κινητή φάση στη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων αποτελείται από έναν οργανικό διαλύτη (60%) και από ένα μικρό ποσοστό νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος. Ένα υδάτινο στρώμα δημιουργείται στην πολική επιφάνεια της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα ο χρόνος κατακράτησης να εξαρτάται από την κατανομή των μορίων μεταξύ της κινητής φάσης και του υδατικού στρώματος στην πολική επιφάνεια της στατικής φάσης<sup>39</sup> (**Εικόνα 10**). Η κατανομή αυτή με τη σειρά της εξαρτάται από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου αλλά και από την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι στατικές φάσεις που επιλέγονται για τη χρωματογραφική μέθοδο αυτή μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες<sup>40</sup>:

1. Ουδέτερες (δεν υπάρχει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τους αναλύτες)
2. Φορτισμένες (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις)
3. Αμφιτεριοντική (ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις)

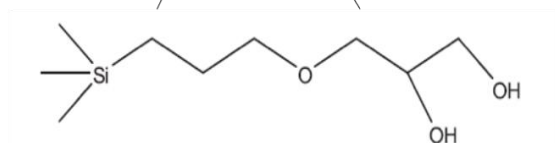


*Εικόνα 10. Ο διαχωρισμός HILIC βασίζεται στο πέρασμα μιας κυρίως οργανικής κινητής φάσης σε μια πολική στατική φάση οδηγώντας στο σχηματισμό ενός υδατικού στρώματος στη στατική φάση. Οι υδρόφιλοι αναλύτες κατανέμονται σε αυτό το στρώμα και καθώς η κινητή φάση γίνεται όλο και περισσότερο υδρόφιλη, εκλύονται με σειρά αυξανόμενης υδροφιλίας<sup>40</sup>.*

Ανάλογα με τη στατική φάση και τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ αυτής και των αναλυτών επηρεάζεται και ο χρόνος κατακράτησης.

### 2.6.1 Στήλη Χρωματογραφίας Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC)

Η στήλη χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων αποτελείται από μια



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση της δομής της στατικής φάσης της στήλης υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων που αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου και ένα μόριο διόλης χημικά συνδεδεμένο σε αυτό<sup>41</sup>.

στατική φάση  
διοξειδίου του  
πυριτίου στην οποία  
βρίσκονται  
συνδεδεμένα μόρια  
διόλης. Η στατική αυτή  
φάση  
προσδίδει έναν  
ιδιαίτερα πολικό  
χαρακτήρα στη στήλη  
και αυξημένες θέσεις  
για τη δημιουργία

δεσμών υδρογόνου<sup>41</sup>. Το πλεονέκτημα της στήλης αυτής έγκειται στο διαχωρισμό υδρόφιλων ενώσεων που δε θα ήταν εφικτό να διαχωριστούν με τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι 5 μm και τα pH στα οποία λειτουργεί η στήλη κυμαίνονται στο εύρος 1-10.

## 2.7 Εφαρμογή της Μεθόδου SEC-ICP-MS

Η μέθοδος SEC-ICP-MS που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους αναλυτικά συστήματα. Το πρώτο αφορά στην υγρή χρωματογραφία (LC) και πιο συγκεκριμένα στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) και το δεύτερο στη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).



Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκε στη σύζευξη της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με σκοπό το διαχωρισμό πρωτεϊνών σιδήρου μεγάλου μοριακού βάρους > 5 kDa από πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους αλλά και των ανόργανων μορφών του σιδήρου.

Η υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε μελέτες διαχωρισμού πρωτεϊνών αλλά και μεταλλοπρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα όπως είναι το μητρικό γάλα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό<sup>25,27,42-44</sup>. Σε συνδυασμό με μεθόδους φασματομετρίας μάζας μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το πρωτεϊνικό προφίλ σε φυσιολογικές καταστάσεις αλλά και σε καταστάσεις ασθένειας.

Στην παρούσα μελέτη, η χρήση της συγκεκριμένης χρωματογραφικής μεθόδου έγκειται στην ήπια μορφή διαχωρισμού που προσφέρει. Τα βιολογικά δείγματα χαρακτηρίζονται από την πολυπλοκότητά τους, καθώς αποτελούνται από μόρια και ενώσεις που μπορούν εύκολα να αλλοιωθούν κατά την αναλυτική πορεία. Η SEC στήλη εξασφαλίζει έως ένα βαθμό την ακεραιότητα των πρωτεϊνών όπως και τη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μετάλλων – υποκαταστατών.

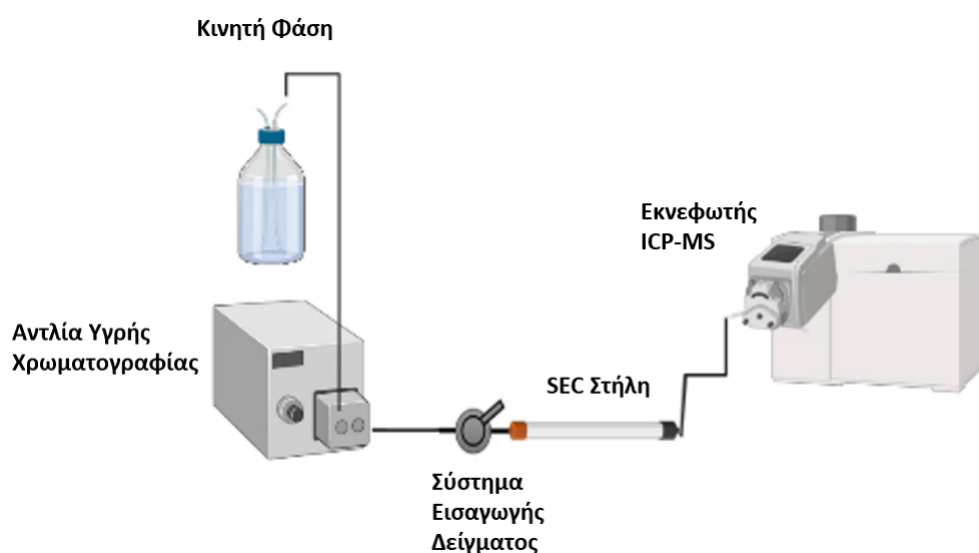
Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι η δυνατότητα επιλογής μιας κινητής φάσης συμβατής με τις απαιτήσεις του προς ανάλυση δείγματος. Λόγω της εύκολης μετουσίωσης των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η εφαρμογή μίας κινητής φάσης που να μην προκαλεί δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες ή διάσπαση των μετάλλων που βρίσκονται συνδεδεμένα σε πρωτεϊνικά και ανόργανα σύμπλοκα.

Η σύζευξη της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος αποσκοπεί στο χαρακτηρισμό του μοριακού βάρους των ενώσεων στις οποίες βρίσκεται συνδεδεμένος ο σίδηρος προκειμένου στη συνέχεια να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αυτών. Η ανάπτυξη της μεθόδου αυτής θα μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δειγμάτων.

## 2.7.1 Περιγραφή της Πειραματικής Διάταξης SEC-ICP-MS

### 2.7.1.1 Στήλη SEC Συνδεδεμένη σε Αντλία Υγρής Χρωματογραφίας

Στο πρώτο μέρος της πειραματικής πορείας που απεικονίζεται στην **Εικόνα 12**, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης της μεθόδου με τη χρήση αντλίας υγρής χρωματογραφίας (Shimadzu LC-20 AD) όπου στη μία γραμμή συνδέθηκε η κινητή φάση  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5 M. Στην αντλία συνδέθηκε και η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος με τις θέσεις φόρτωσης και έγχυσης του δείγματος.



**Εικόνα 12.** Πειραματική διάταξη SEC συνδεδεμένη σε αντλία υγρής χρωματογραφίας και στο ICP-MS.

Στο σύστημα εισαγωγής βρίσκεται συνδεδεμένη και η στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού Hitrap Desalting 5 mL η οποία καταλήγει στον εκνεφωτή του φασματομέτρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος. Οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Πριν την έναρξη της αναλυτικής πορείας η χρωματογραφική στήλη ξεπλένεται με την κινητή φάση  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5 M, αφού έχει προηγηθεί απαέρωση της κινητής φάσης για να μην δημιουργηθεί πρόβλημα στη στήλη, με όγκο πενταπλάσιο της στήλης προκειμένου να γίνει κορεσμός της στήλης με το διάλυμα που αποτελεί την κινητή φάση της

χρωματογραφικής ανάλυσης. Επιπλέον, πριν την έναρξη λειτουργίας της αντλίας εφαρμόζεται η λειτουργία Purge, προκειμένου οι σωληνώσεις της αντλίας να ξεπλυθούν από προηγούμενους διαλύτες, να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες αλλά και να γεμίσουν με τον επιθυμητό διαλύτη, στη συγκεκριμένη περίπτωση  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5 M.

**Πίνακας 1: Παράμετροι χρωματογραφικής ανάλυσης**

<b>Παράμετροι Χρωματογραφικής Ανάλυσης</b>	
<b>Κινητή Φάση</b>	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1,5 M pH ~ 7
<b>Ταχύτητα Ροής Κινητής Φάσης</b>	1 mL/min
<b>Ποσότητα Δείγματος</b>	200 $\mu\text{L}$
<b>Χρόνος Ανάλυσης Κάθε Δείγματος</b>	10 λεπτά

Εν συνεχεία, πριν τη σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος γίνεται STD performance check μετά την εκκίνηση του φασματόμετρου. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στον έλεγχο και στη βελτιστοποίηση παραμέτρων του οργάνου που επηρεάζουν άμεσα την ορθή λειτουργία και ανάλυση του οργάνου. Οι παράμετροι αυτοί αφορούν τα εξής:

- Ροή αερίου στον εκνεφωτή
- Βαθμονόμηση μαζών
- Εφαρμοζόμενη τάση στον ανιχνευτή
- Ευθυγράμμιση του πυρσού
- Έλεγχο υποβάθρου και ευαισθησίας

Η διαδικασία ξεκινάει με την εισαγωγή διαλύματος που περιλαμβάνει τα στοιχεία Ίνδιο (In), Βηρύλλιο (Be), Δημήτριο (Ce), Μόλυβδο (Pb), Ουράνιο (U), Σίδηρο (Fe),

Λίθιο (Li) και Μαγνήσιο (Mg) σε συγκέντρωση 1 µg/L σε 1% HNO<sub>3</sub>. Μόλις ολοκληρωθεί η δοκιμή εμφανίζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου. Για να ξεκινήσει η αναλυτική διαδικασία τα επιθυμητά αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

*Πίνακας 2: STD Performance check*

<b>STD Performance Check</b>	
<b>In 114.904</b>	<b>&gt; 40.000</b>
<b>U 238.05</b>	<b>&gt; 30.000</b>
<b>Be 9.0122</b>	<b>&gt; 2.000</b>
<b>CeO 155.9/Ce 139.905</b>	<b>≤ 0,025</b>

### 2.7.1.2 Στήλη SEC Συνδεδεμένη στην Περισταλτική Αντλία του ICP-MS

Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής πορείας επιλέχθηκε σαν βέλτιστη πειραματική



διάταξη η σύζευξη της στήλης SEC απευθείας με την περισταλτική αντλία του ICP-MS. Το σύστημα αποτελείται από μία στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού HiTrap Desalting όγκου 5 mL συνδεδεμένη με την περισταλτική αντλία του ICP-MS και τον εκνεφωτή του οργάνου όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 13**. Στην περισταλτική αντλία βρίσκεται το σωληνάκι που μεταφέρει το δείγμα στον εκνεφωτή του οργάνου.

**Εικόνα 13.** Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της μεθόδου SEC-ICP-MS.

Για τη μέθοδο αυτή τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι

A) Υπερκάθαρο νερό και B) Διάλυμα 14 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA), 66 mM KOH, 74 mM HCOOH, 5.6 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH ~ 4.22. Προκειμένου να επιτευχθεί ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται χειροκίνητη εναλλαγή των διαλυμάτων A) και B) όπως και εισαγωγή του δείγματος. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης ενώ στον Πίνακα 4 η μέθοδος εναλλαγής των διαλυμάτων.

**Πίνακας 3: Παράμετροι χρωματογραφικής ανάλυσης**

<b>Παράμετροι Χρωματογραφικής Ανάλυσης</b>	
<b>Κινητές Φάσεις</b>	A) Υπερκάθαρο νερό B) 14 mM 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDCA), 66mM KOH, 74 mM HCOOH, 5.6 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH ~ 4.22
<b>Ταχύτητα Ροής Κινητής Φάσης</b>	1 mL/min
<b>Ποσότητα Δείγματος</b>	200 μL
<b>Χρόνος Ανάλυσης Κάθε Δείγματος</b>	20 λεπτά

**Πίνακας 4: Μέθοδος SEC-ICP-MS**

<b>Χρόνος (s)</b>	<b>Διάλυμα A)</b>	<b>Διάλυμα B)</b>	<b>Δείγμα (200 μL)</b>
0	-	-	✓
0-250	✓	-	-
250-650	-	✓	-
650-1.200	✓	-	-

Προτού ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία η στήλη ξεπλένεται με την κινητή φάση **A** με όγκο πενταπλάσιο από τον όγκο της στήλης προκειμένου να γίνει η εξισορρόπηση της στήλης με το διάλυμα που αποτελεί την κινητή φάση του

χρωματογραφικού διαχωρισμού. Το διάλυμα **B** περιέχει 14 mM 2,6 pyridinedicarboxylic acid, που αποτελεί χηλικό παράγοντα σιδήρου και λόγω της δημιουργίας συμπλοκών ενώσεων με ιόντα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε μελέτες προσδιορισμού των διαφορετικών ειδών σιδήρου με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας<sup>28</sup>. Προτού γίνει η σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας πραγματοποιείται STD performance check όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

## 2.7.2 Περιγραφή της Πειραματικής Πορείας SEC-ICP-MS

### 2.7.2.1 Πειραματική Πορεία Διάταξης : Στήλη SEC Συνδεδεμένη σε Αντλία Υγρής Χρωματογραφίας

Η αναλυτική πορεία ξεκινά με την ανάλυση του τυφλού δείγματος (blank) που αποτελεί το υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια αναλύονται πρότυπα διαλύματα τρισθενούς ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) καθώς και δισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) που έχουν παρασκευαστεί την ίδια ημέρα καθώς και το πρότυπο διάλυμα τρανσφερίνης. Στη συνέχεια αναλύθηκαν τα δείγματα μακροφάγων κυττάρων μυελού των οστών από ποντικούς C57BL/6 και διαγονιδιακούς ποντικούς STEAP4-/-.

Η διαδικασία ξεκινάει με την εισαγωγή 200  $\mu\text{L}$  μέσω σύριγγας Hamilton στο βρόγχο του συστήματος εισαγωγής του δείγματος όταν αυτό βρίσκεται στη θέση load (φόρτωση δείγματος). Καθώς ο βρόγχος είναι 100  $\mu\text{L}$ , το ήμισυ του εκάστοτε δείγματος συγκρατείται από αυτόν ενώ το υπόλοιπο περνάει στα απόβλητα. Με την ακαριαία, για να αποφευχθούν οι κενοί όγκοι, εναλλαγή από τη θέση load στη θέση inject (έγχυση δείγματος) απομακρύνεται η σύριγγα και ξεκινά η χρωματογραφική ανάλυση. Η σύριγγα ξεπλένεται με την κινητή φάση για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε περίσσεια δείγματος και το ίδιο γίνεται με το σύστημα εισαγωγής του δείγματος όταν βρίσκεται στη θέση inject.

Το έκλουσμα μέσω της ροής αερίου Ar φτάνει στην άκρη του εκνεφωτή, που βρίσκεται προσαρμοσμένος εντός του κυκλωνικού θαλάμου εκνέφωσης, μετατρέπεται σε αερόλυμα και εισέρχεται στην πηγή ιοντισμού, το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αερίου αργού (Ar). Αυτό οδηγεί στη δημιουργία θετικά μονοφορτισμένων ατομικών ιόντων που στη συνέχεια κατευθύνονται στον τετραπολικό αναλυτή μάζας.

Το τετράπολο επιτρέπει μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο  $m/z$  να συνεχίσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή, ο οποίος πρόκειται για έναν ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή. Τέλος, τα δεδομένα συλλέγονται και επεξεργάζονται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Οι παράμετροι χρήσης του ICP-MS αναγράφονται στον Πίνακα 5.

*Πίνακας 5. Παράμετροι Λειτουργίας*

Παράμετροι ICP-MS	
<b>Analytes</b>	$^{34}\text{S}$ , $^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$
<b>Dwell Time</b>	100 ms
<b>Profile</b>	Helium Kinetic Energy Discrimination
<b>Helium Flow</b>	4 mL/min

Για τον προσδιορισμό του σιδήρου είναι απαραίτητη η χρήση της μεθόδου **Kinetic Energy Discrimination**. Το ισότοπο του σιδήρου που παρακολουθείται είναι το  $^{56}\text{Fe}$  που αντιστοιχεί στο ισότοπο μεγαλύτερης αφθονίας. Με τη χρήση της συμβατικής λειτουργίας του οργάνου δημιουργούνται ιόντα  $\text{ArO}^+$  από την αντίδραση του αερίου Ar με το οξυγόνο. Τα ιόντα αυτά αποτελούν ισοβαρική παρεμπόδιση για τον σίδηρο 56 καθώς έχουν την ίδια μάζα δίνοντας τον ίδιο λόγο μάζας προς φορτίο. Για την αποφυγή των παρεμποδίσεων αυτών επιλέγεται η εφαρμογή της κυψελίδας



πρόσκρουσης. Για τη λειτουργία αυτή το αέριο που χρησιμοποιείται είναι το ήλιο (He). Τα πολυατομικά ιόντα διαθέτουν μεγαλύτερη διατομή από τα ατομικά ιόντα του εκάστοτε στοιχείου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότερες κρούσεις μεταξύ των πρώτων με το αέριο της κυψελίδας πρόσκρουσης. Η κινητική ενέργεια των πολυατομικών ιόντων μειώνεται περισσότερο με τις αλληπάλληλες συγκρούσεις σε σχέση με την κινητική ενέργεια του αναλύτη. Κατά αυτόν τον τρόπο στον ανιχνευτή φτάνουν τα ιόντα του αναλύτη ενώ τα πολυατομικά ιόντα δεν ανιχνεύονται<sup>46</sup>.

Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης το σύστημα πρέπει να ελέγχεται για τυχόν διαρροές αλλά και για απότομες αλλαγές στην πίεση που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν προβλήματα στην αναλυτική πορεία και τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

#### *2.7.2.2 Πειραματική Πορεία Διάταξης : Στήλη SEC Συνδεδεμένη στην Περισταλτική Αντλία του ICP-MS*

Η αναλυτική πορεία ξεκινά με την ανάλυση του τυφλού δείγματος (blank) που αποτελεί το υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια αναλύονται πρότυπα διαλύματα τρισθενούς ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) καθώς και δισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) που έχουν παρασκευαστεί την ίδια ημέρα καθώς και το πρότυπο διάλυμα τρανσφερίνης.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με την έγχυση του δείγματος (100  $\mu\text{L}$ ), τη χρονική στιγμή  $t=0$ , μέσω της περισταλτικής αντλίας με ταχύτητα ροής 1 mL/min στη στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και των ανόργανων ενώσεων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Μετά την εισαγωγή του δείγματος, για 250 s περνάει από τη γραμμή το διάλυμα **A** (υπερκάθαρο νερό), με σκοπό την έκλυση των πρωτεϊνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους που δεν αλληλοεπιδρούν με τη στήλη και εκλύονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η επιλογή του νερού σαν κινητή φάση βασίζεται στην ανάγκη διατήρησης της αλληλεπίδρασης του σιδήρου με τις πρωτεΐνες αλλά και των συμπλόκων στα

οποία βρίσκεται δεσμευμένος ο σίδηρος στις διαφορετικές μορφές του. Επιπλέον, αποτελεί διάλυμα συμβατό και με τη χρωματογραφική στήλη αλλά και με το ICP-MS. Εν συνεχεία, για άλλα 400 s, περνάει από το σύστημα το διάλυμα **B**, διάλυμα αυξημένης ιοντικής ισχύος, προκειμένου να εκλουστούν μόρια μικρότερου μοριακού βάρους που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη χρωματογραφική στήλη. Η προσθήκη του 2,6 pyridinedicarboxylic acid στην κινητή φάση ενισχύει την έκλυση ελεύθερου σιδήρου, δημιουργώντας σύμπλοκες ενώσεις<sup>28</sup>, αλλά και άλλων μορφών σιδήρου που αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη στατική φάση της στήλης και δεν εκλούνται με το νερό.

Τέλος για άλλα 550 s περνάει διάλυμα **A** από το σύστημα προκειμένου να ξεπλυθεί από το διάλυμα **B**. Στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη, η παρατεταμένη ροή του διαλύματος από το σύστημα οδηγεί σε υψηλό υπόβαθρο σιδήρου.

Το έκλουσμα με τον τρόπο που αναλύθηκε παραπάνω μεταφέρεται στον θάλαμο εκνέφωσης του ICP-MS και στη συνέχεια ιοντίζεται και ανιχνεύεται.

## **2.8 Ανάπτυξη και Εφαρμογή της Μεθόδου HILIC-ICP-MS**

Η μέθοδος HILIC-ICP MS που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους τμήματα. Το πρώτο αφορά στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και πιο συγκεκριμένα στη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων και το δεύτερο στη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).

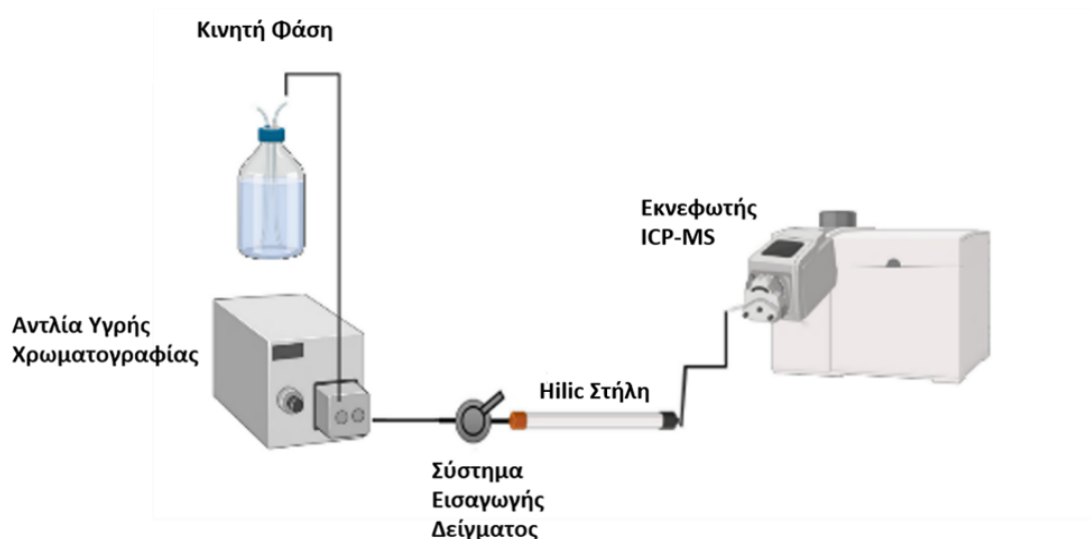
Η επιλογή της στήλης HILIC βασίστηκε στο μεγάλο εύρος αναλυτών που μπορεί να διαχωρίσει ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν μέρος μεταξύ του αναλύτη της στατικής φάσης της στήλης καθώς και της κινητής φάσης. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως σε φαρμακευτικές, βιοιατρικές καθώς και φαρμακευτικές αναλύσεις<sup>47</sup> για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, πεπτιδίων ακόμη και αντισωμάτων<sup>48</sup>. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε χαρακτηρίζεται από μία στατική φάση διόλης όπου στην πολική επιφάνεια αυτής δημιουργείται ένα υδάτινο

στρώμα κινητής φάσης που μπορεί να αλληλεπιδράσει με ποικίλους τρόπους με τους διαφορετικούς αναλύτες. Υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου, αλληλεπίδρασης διπόλου – διπόλου αλλά και ιόντος διπόλου<sup>41,49</sup>.

Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκε στη σύζευξη της χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με σκοπό το διαχωρισμό των ανόργανων μορφών του σιδήρου με βάση την πολικότητα και το φορτίο τους.

### 2.8.1 Περιγραφή της Πειραματικής Διάταξης HILIC- ICP- MS

Το σύστημα αποτελείται από μία αντλία ρυθμιζόμενης ροής και πίεσης (Thermo Scientific Dionex AXP-MS Auxiliary Pump). Η αντλία παρέχει τη κινητή φάση 14 mM 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDCA), 66mM KOH, 74mM HCOOH, 5.6mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH ~ 4.22. Η αντλία βρίσκεται συνδεδεμένη με το σύστημα έγχυσης δείγματος που διαθέτει δύο θέσεις λειτουργίας όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Στη βαλβίδα εισαγωγής βρίσκεται συνδεδεμένη η στήλη υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων Fortis HILIC DIOL 100Å 5 μm, 2.1 x 150 mm.



**Εικόνα 14.** Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης HILIC-ICP-MS

Με τη σειρά της η στήλη συνδέεται με τον εκνεφωτή του φασματόμετρου. Η πειραματική διάταξη ολοκληρώνεται με το φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος NexION 350X ICP-MS με χρήση του λογισμικού Syngistix, της εταιρείας Perkin Elmer.

Προτού ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία η στήλη ξεπλένεται με την κινητή φάση **B** με όγκο πενταπλάσιο από τον όγκο της στήλης προκειμένου να γίνει η εξισορρόπηση της στήλης.

Εν συνεχεία, πριν τη σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος γίνεται STD performance check μετά την εκκίνηση του φασματόμετρου όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι παράμετροι της χρωματογραφικής ανάλυσης.

*Πίνακας 5: Παράμετροι χρωματογραφικής ανάλυσης*

<b>Παράμετροι Χρωματογραφικής Ανάλυσης</b>	
<b>Κινητές Φάσεις</b>	B) 14 mM 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDCA), 66 mM KOH, 74 mM HCOOH, 5.6 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH ~ 4.22
<b>Ταχύτητα Ροής Κινητής Φάσης</b>	0,3 mL/min
<b>Ποσότητα Δείγματος</b>	12 μL
<b>Χρόνος Ανάλυσης Κάθε Δείγματος</b>	5 λεπτά

### 2.8.2 Περιγραφή της Πειραματικής Πορείας HILIC-ICP-MS

Η αναλυτική πορεία ξεκινά με την ανάλυση του τυφλού δείγματος (blank) που αποτελεί το υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια αναλύονται πρότυπα διαλύματα τρισθενούς ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) καθώς και δισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_6$ ) που έχουν παρασκευαστεί την ίδια ημέρα.

Η συσκευή εισαγωγής δείγματος ρυθμίζεται στη θέση φόρτωσης και 200  $\mu\text{L}$  δείγματος εισάγονται στη συσκευή μέσω μιας σύριγγας Hamilton. Ο βρόγχος συγκρατεί τα 12  $\mu\text{L}$  του δείγματος και τα υπόλοιπα απομακρύνονται στα απόβλητα. Η σύριγγα δεν απομακρύνεται προκειμένου να μην εισαχθεί αέρας στο βρόγχο και περάσει στη συνέχεια στη στήλη με την έγχυση του δείγματος. Με την έναρξη της ανάλυσης γίνεται ταυτόχρονη εναλλαγή του συστήματος στη θέση έγχυσης του δείγματος. Η σύριγγα ξεπλένεται με διάλυμα Β για να αποφευχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης.

Το διάλυμα Β χρησιμοποιείται επίσης για πλύσεις του βρόγχου όταν το σύστημα εισαγωγής βρίσκεται στη ρύθμιση έγχυσης για να μπορέσει το σύστημα να ξεπλυθεί από το εκάστοτε δείγμα που έχει εισαχθεί.

Μετά από την έγχυση του δείγματος από το βρόγχο, το δείγμα μεταφέρεται στη χρωματογραφική στήλη όπου τα διαφορετικά είδη σιδήρου θα διαχωριστούν ανάλογα με την κατανομή τους ανάμεσα στη στατική φάση και στο υδατικό στρώμα της κινητής φάσης.

Τέλος, το έκλουσμα μέσω της ροής αερίου  $\text{Ar}$  φτάνει στην άκρη του εκνεφωτή, που βρίσκεται προσαρμοσμένος εντός του κυκλωνικού θαλάμου εκνέφωσης, μετατρέπεται σε αερόλυμα και εισέρχεται στην πηγή ιοντισμού, το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αερίου αργού ( $\text{Ar}$ ). Αυτό οδηγεί στη δημιουργία θετικά μονοφορτισμένων ατομικών ιόντων που στη συνέχεια κατευθύνονται στο τετράπολο.

Το τετράπολο επιτρέπει μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο φορτίου προς μάζα  $m/z$  να συνεχίσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή, ο οποίος είναι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής. Τα δεδομένα συλλέγονται και επεξεργάζονται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Μελέτη της επίδρασης εξωγενών πηγών σιδήρου στην παθογένεση της Μουκορμύκωσης

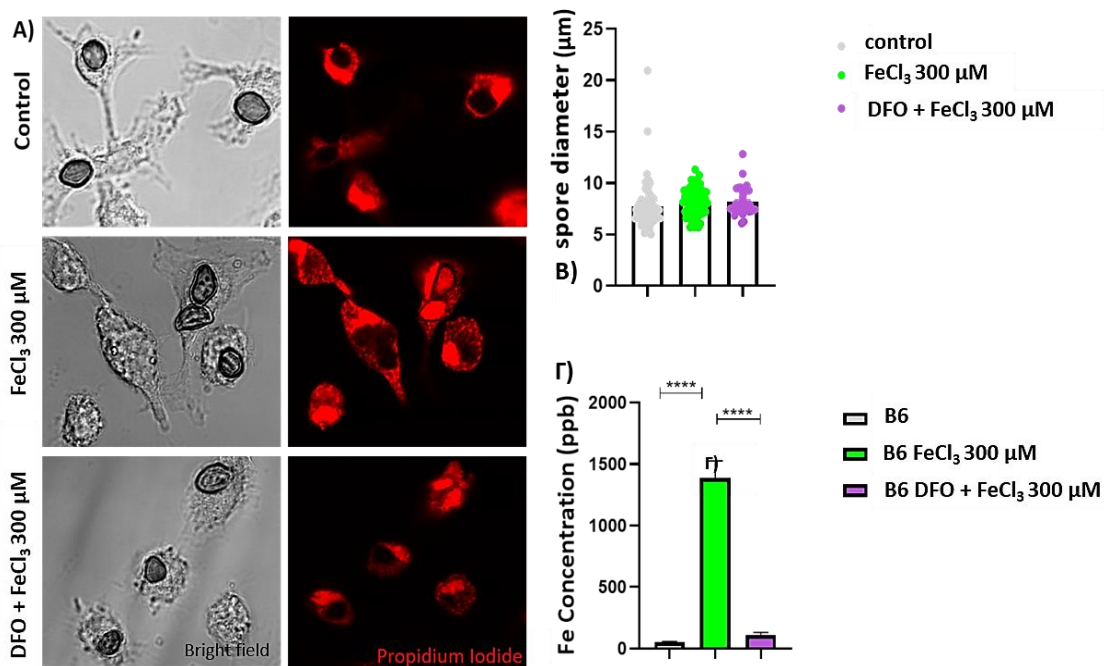
3.1.1 Η υπερφόρτωση μακροφάγων μυελού των οστών με  $FeCl_3$  και *Deferoxamine* οδηγεί σε ήπια αύξηση της ανάπτυξης του *Rhizopus delemar*.

Όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενη μελέτη<sup>18</sup>, τα κονίδια του μύκητα *Rhizopus delemar* μετά τη φαγοκυττάρωση από τα κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα του πνεύμονα παραμένουν σε μια λανθάνουσα κατάσταση στο εσωτερικό των κυττάρων για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (10 μέρες) σε in vivo μοντέλα λοίμωξης ανοσοεπαρκών ποντικών. Στην περίπτωση αυτή δε δημιουργείται διηθητική λοίμωξη καθώς δεν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα, συνθήκες που έχουν αναφερθεί παραπάνω (Παράρτημα 1.4.3, 1.4.5).

Αντιθέτως, η υπερφόρτωση μακροφάγων κυττάρων, διαφοροποιημένων από μυελό των οστών, με σίδηρο οδηγεί σε ανάπτυξη του μύκητα *Rhizopus delemar* και εκβλάστηση από το εσωτερικό των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια αναπαραγωγής του μοντέλου υπερφόρτωσης των μακροφάγων με σίδηρο και μόλυνση αυτών με το μύκητα. Μακροφάγα κύτταρα ποντικών C57BL/6 απομονώθηκαν και διαφοροποιήθηκαν από το μυελό των οστών. Στη συνέχεια υπέστησαν 24ωρη επώαση με εξωγενείς πηγές σιδήρου, είτε  $FeCl_3$  είτε DFO +  $FeCl_3$  300  $\mu$ M (*Deferoxamine*) για 24 ώρες. Μετά την επώαση ακολούθησε μόλυνση των κυττάρων για 16 περίπου ώρες.

Παρόλη την αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου στα κύτταρα που έχουν υποστεί επώαση με  $FeCl_3$ , που ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, η ανάπτυξη του μύκητα είναι ήπια και δεν οδηγεί στη δημιουργία εκβλαστήσεων από τα κύτταρα (Εικόνα 15 Α,Γ).



**Εικόνα 15.** Μακροφάγα κύτταρα από μυελό των οστών C57BL/6 ποντικού υπερφορτωμένα για 24 ώρες με FeCl<sub>3</sub> 300 μM, DFO 300 μM και FeCl<sub>3</sub> 300 μM A) Εικόνες από confocal microscopy των μακροφάγων μετά από μόλυνση με το μύκητα *Rhizopus delemar* για 16 ώρες B) Μέτρηση του μήκους των σπορίων του *Rhizopus delemar* μετά από 16 ώρες μόλυνσης των μακροφάγων Γ) Μέτρηση της συγκέντρωσης του σιδήρου στα μακροφάγα κύτταρα χωρίς μόλυνση από μύκητα με τη μέθοδο ICP-MS.

Η μέτρηση της διαμέτρου των σπορίων που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων έδειξε αύξηση της διαμέτρου στις περιπτώσεις επώασης των κυττάρων πριν τη μόλυνση με τις εξωγενείς πηγές σιδήρου, χωρίς όμως να προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 15 B).

Από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων του σιδήρου στα υπερφορτωμένα με σίδηρο κύτταρα προκύπτει πως στην περίπτωση της επώασης με DFO + FeCl<sub>3</sub> δεν υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου, γεγονός που γεννά ερωτήματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της δεφεροξαμίνης να εισάγει σίδηρο στο εσωτερικό των κυττάρων. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως η δεφεροξαμίνη δε μπορεί εύκολα να δράσει στο εσωτερικό των κυττάρων, λόγω της υδροφιλικότητάς της, αλλά και του μεγάλου μοριακού της βάρους<sup>50</sup>, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την απουσία αύξησης της συγκέντρωσης του σιδήρου στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το αντιδραστήριο.

### 3.1.2 Επίδραση διαφορετικών εξωγενών πηγών σιδήρου σε μακροφάγα κύτταρα μολυσμένα με *Rhizopus delemar*.

Η διατήρηση της ομοιόστασης του σιδήρου αποτελεί μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες του οργανισμού. Ο σίδηρος απορροφάται από το δωδεκαδάκτυλο του εντέρου και μεταφέρεται και αποθηκεύεται σε διάφορα σημεία του σώματος από πρωτεΐνες σιδήρου.

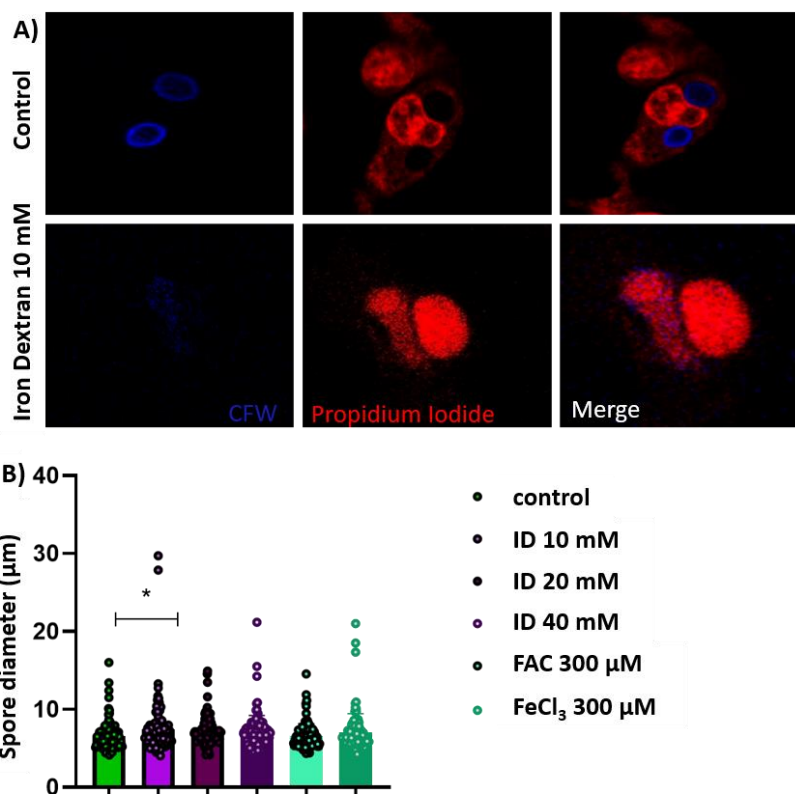
Ανάλογα με τη μορφή του σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) ενεργοποιούνται τα κατάλληλα συστήματα του κυττάρου για την ενσωμάτωσή του<sup>51,52</sup>. Όταν ο σίδηρος βρίσκεται στην τρισθενή του μορφή όπως στα διαλύματα  $FeCl_3$  και Ferric ammonium citrate (FAC) προκειμένου να εισαχθεί στα κύτταρα ανάγεται στη δισθενή του μορφή από αναγωγικά συστήματα που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου και στη συνέχεια εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου από πρωτεΐνες μεταφορείς. Έπειτα οξειδώνεται εκ νέου στη μη τοξική τρισθενή μορφή του.

Αντιθέτως, μεταλλικά σύμπλοκα σιδήρου αποτελούμενα από υδρογονάνθρακες κατά κόρον ενσωματώνονται στα κύτταρα με διαφορετικούς μηχανισμούς<sup>53</sup>. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα αυτά ενδοκυτταρώνονται και στη συνέχεια μετά τη σύντηξη του ενδοσώματος με τα λυσοσώματα το όξινο και αναγωγικό περιβάλλον που δημιουργείται οδηγεί σε απελευθέρωση και αναγωγή του σιδήρου, ο οποίος στη συνέχεια είτε θα αποθηκευτεί με τη μορφή της φερριτίνης, είτε θα μεταφερθεί σε άλλα σημεία για εκμετάλλευσή του.

Για να μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών αυτών μορφών σιδήρου στο *ex vivo* μοντέλο λοίμωξης από το μύκητα ενδιαφέροντος, μακροφάγα κύτταρα από C57BL/6 ποντίκια επωάστηκαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Iron dextran 10, 20, 40 mM, FAC και  $FeCl_3$  300  $\mu$ M. Μετά το πέρας των 24 ωρών μολύνθηκαν με κονίδια του μύκητα για 16 ώρες. Η αξιολόγηση έγινε εκ νέου με τη μέτρηση της διαμέτρου των ενδοκυττάρων κονιδίων. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως στην



περίπτωση της επώασης με iron dextran υπάρχει μια αυξητική τάση η οποία όμως δείχνει στατιστικά σημαντική στα 10 mM (Εικόνα 16 A,B).



**Εικόνα 16.** Μακροφάγα κύτταρα από μυελό των οστών C57BL/6 ποντικού υπερφορτωμένα για 24 ώρες με FeCl<sub>3</sub> 300 μM, Ferric ammonium citrate 300 μM, Iron dextran 10, 20, 40 mM A) Εικόνες από confocal microscopy των μακροφάγων (propidium iodide) μετά από μόλυνση με το μύκητα *Rhizopus delemar calcofluor white* (CFW) για 16 ώρες B) Μέτρηση του μήκους των σπορίων του *Rhizopus delemar* μετά από 16 ώρες μόλυνσης των μακροφάγων.

Στην περίπτωση της επώασης με τα αντιδραστήρια FeCl<sub>3</sub> και FAC υπάρχει αρκετά ήπια αύξηση στη διάμετρο των κονιδίων σε σχέση με τις συνθήκες επώασης με το iron dextran. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η συγκέντρωση 10 mM του αντιδραστηρίου iron dextran κρίθηκε η καταλληλότερη για την εγκαθίδρυση πειραματικών μοντέλων λοιμώξεων μακροφάγων κυττάρων με το μύκητα *Rhizopus delemar* σε περιβάλλον περίσσειας σιδήρου.

### 3.2 Η αναγωγή σιδήρου STEAP 4 ρυθμιστής της λοίμωξης από το μύκητα *Rhizopus delemar*.

Από προηγούμενη έρευνα<sup>18</sup>, έχει γίνει γνωστό πως κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μακροφάγων κυττάρων με το μύκητα *Rhizopus delemar* μειώνεται η έκφραση της STEAP4, μιας αναγωγής μετάλλων η οποία έχει συσχετιστεί με μεταβολικές διαταραχές όπως ο διαβήτης.

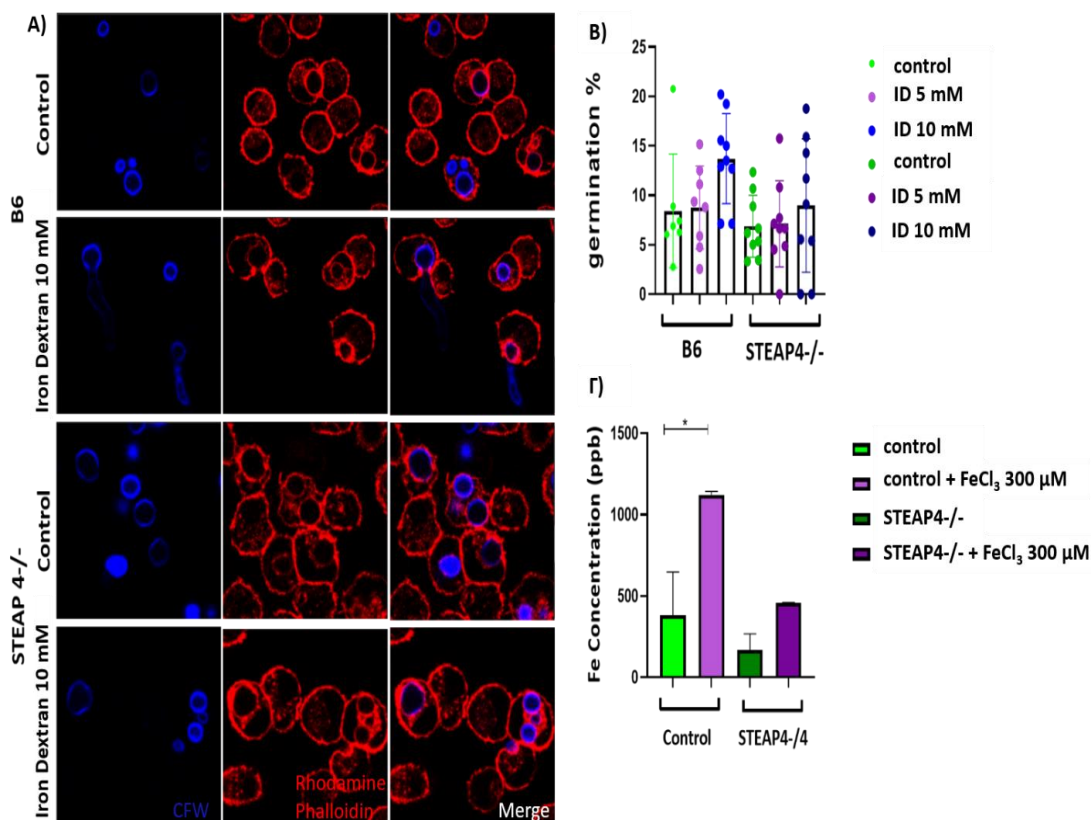
Η STEAP4 είναι μια πρωτεΐνη η κύρια λειτουργία της οποίας είναι η αναγωγή των μετάλλων  $Fe^{3+}$  και  $Cu^{2+}$ , διαδραματίζοντας κυρίαρχο ρόλο στην διατήρηση του ενδοκυττάρου επιπέδου των μετάλλων σε φυσιολογικά όρια. Εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων αλλά λειτουργεί και σε διαμερίσματα του κυττάρου όπως τα ενδοσώματα και σε κοκκία<sup>54</sup>. Επιπλέον, συσχετίζεται με αρκετές μεταβολικές διαταραχές όπως ο διαβήτης χωρίς όμως ενδελεχή μελέτη του ρόλου της στις διαταραχές αυτές. Η έλλειψη της STEAP4 αναγωγής σε μοντέλα ποντικών προκαλεί αντοχή στην ινσουλίνη και παχυσαρκία ενισχύοντας τη συσχέτισή της πρωτεΐνης με τις μεταβολικές διαταραχές<sup>55</sup>.

Με βάση τα παραπάνω μελετήθηκε ο ρόλος της STEAP4 αναγωγής στη λοίμωξη από *Rhizopus delemar*. Κυψελιδικά μακροφάγα από C57BL/6 και STEAP4-/- ποντίκια επωάστηκαν για 18 ώρες με iron dextran 5 και 10 mM και στη συνέχεια μολύνθηκαν με το μύκητα. Μετά από 7 ώρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού αποκτήθηκαν οι εικόνες που παρατίθενται στην **εικόνα 17 A**.

Έπειτα, μετρήθηκε το ποσοστό εκβλάστησης των κονιδίων του μύκητα μέσα από τα κύτταρα. Παρά την έλλειψη στατιστικής σημασίας, το ποσοστό εκβλάστησης των μυκήτων στα μακροφάγα κύτταρα φυσιολογικών C57BL/6 ποντικών, που είχαν επωαστεί με σίδηρο με τη μορφή iron dextran, σχεδόν διπλασιάζεται γεγονός που αποδεικνύει την αδυναμία των κυττάρων αυτών να περιορίσουν την ανάπτυξη του μύκητα (**Εικόνα 17 B**).

Αντιθέτως, η μέτρηση του ποσοστού εκβλάστησης των κονιδίων του μύκητα από τα STEAP4-/- κυψελιδικά μακροφάγα δεν παρουσιάζει αλλαγή στην περίπτωση

επώασης των κυττάρων με σίδηρο. Από τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα πως η έλλειψη της STEAP4 αναγωγάσης οδηγεί σε αντίσταση στη λοίμωξη από το *Rhizopus* ακόμη και στην περίπτωση της επώασης με σίδηρο.



**Εικόνα 17.** Κυψελιδικά μακροφάγα C57BL/6 και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικού υπερφορτωμένα για 18 ώρες με Iron dextran 5 και 10 mM A) Εικόνες από confocal microscopy των μακροφάγων (Rhodamine Phalloidin) μετά από μόλυνση με το μύκητα *Rhizopus delemar* calcofluor white (CFW) για 7 ώρες B) Μέτρηση του μήκους των σπορίων του *Rhizopus delemar* μετά από 7 ώρες μόλυνσης των μακροφάγων Γ) Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του σιδήρου σε μακροφάγα μυελού των οστών C57BL/6 και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικού υπερφορτωμένων για 24 ώρες με FeCl<sub>3</sub> 300 μM με τη μέθοδο ICP-MS.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευθούν από την αδυναμία συσσώρευσης σιδήρου, προϋπόθεση για την ανάπτυξη του μύκητα, στο εσωτερικό των κυττάρων STEAP4<sup>-/-</sup>.

Όπως αποδεικνύεται από τη μέτρηση της συγκέντρωσης του σιδήρου σε μακροφάγα κύτταρα μυελού των οστών, φυσιολογικών C57BL/6 ποντικών αλλά και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικών, επωασμένων ή μη με εξωγενή πηγή σιδήρου FeCl<sub>3</sub> 300 μM για 24 ώρες, τα STEAP4<sup>-/-</sup> μακροφάγα μετά την επώαση με σίδηρο δεν αυξάνουν στον ίδιο βαθμό με

τα μακροφάγα από φυσιολογικούς ποντικούς τη συγκέντρωση του σιδήρου στο εσωτερικό τους (**Εικόνα 17 Γ**). Η αδυναμία συσσώρευσης σιδήρου στο εσωτερικό των STEAP4-/- κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό του διαθέσιμου, για το παθογόνο, σιδήρου με αποτέλεσμα την προστασία από τη λοίμωξη. Οι παραπάνω ποσοτικοποιήσεις ενδοκυττάρου σιδήρου πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).

### **3.3 Ο ρόλος του σιδήρου στην παθογένεση της Μουκορμύκωσης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.**

#### *3.3.1 Η οξέωση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη λοίμωξης σε in vivo μοντέλο διαβήτη ποντικών.*

Ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μουκορμύκωσης είναι ο σακχαρώδης διαβήτης. Μελέτες έχουν δείξει πως το 36-40% των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών με μουκορμύκωση πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη<sup>56,57</sup>. Από αυτούς ένα μεγάλο ποσοστό δεν ελέγχεται επαρκώς και αναπτύσσει διαβητική οξέωση.

Η διαβητική οξέωση προκύπτει όταν τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια ινσουλίνης<sup>58</sup> με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται κετόνες στον οργανισμό που με τη σειρά τους μειώνουν το pH στον ορό του αίματος. Η μείωση αυτή έχει παρατηρηθεί πως ευνοεί την ανάπτυξη του *Rhizopus* στον ορό. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στη μείωση της ικανότητας πρόσδεσης του σιδήρου στην τρανσφερίνη λόγω του όξινου περιβάλλοντος που οδηγεί στην ύπαρξη αυξημένου διαθέσιμου ελεύθερου σιδήρου στον ορό του αίματος<sup>59</sup>.

Με βάση τα παραπάνω έγινε η προσπάθεια δημιουργίας ενός μοντέλου διαβητικών οξεοτικών ποντικών, με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του σιδήρου σε μοντέλο ποντικού επιρρεπή σε ανάπτυξη λοίμωξης από το μύκητα *Rhizopus delemar*, με τη χρήση Streptozotocin, ενός αντιδραστηρίου που έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή

χορήγηση καταστρέφει τα β-παγκρεατικά κύτταρα<sup>60</sup> προκαλώντας διαβήτη τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενο).

Αρσενικά ποντίκια C57BL/6 8-12 εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα πειράματα. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες ποντικών ανάλογα με τη δόση streptozotocin που τους χορηγήθηκε (150-200 mg/kg). Μετά από 7 μέρες χορήγησης του αντιδραστηρίου μετρήθηκε η τιμή της γλυκόζης στο αίμα τους καθώς και η ύπαρξη κετονών στα ούρα για να διαπιστωθεί ο διαβήτης και η ύπαρξη οξέωσης. Η γλυκόζη μετρήθηκε με συσκευή μέτρησης γλυκόζης για διαβητικούς ασθενείς και οι κετόνες στα ούρα των ποντικών με ταινίες μέτρησης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 6. Η ύπαρξη κετονών υποδεικνύεται με την αντίστοιχη τιμή που προέκυψε, ενώ η απουσία κετονών δηλώνεται με το σήμα -.

**Πίνακας 6. Πίνακας μετρήσεων γλυκόζης και κετονών σε ποντίκια**

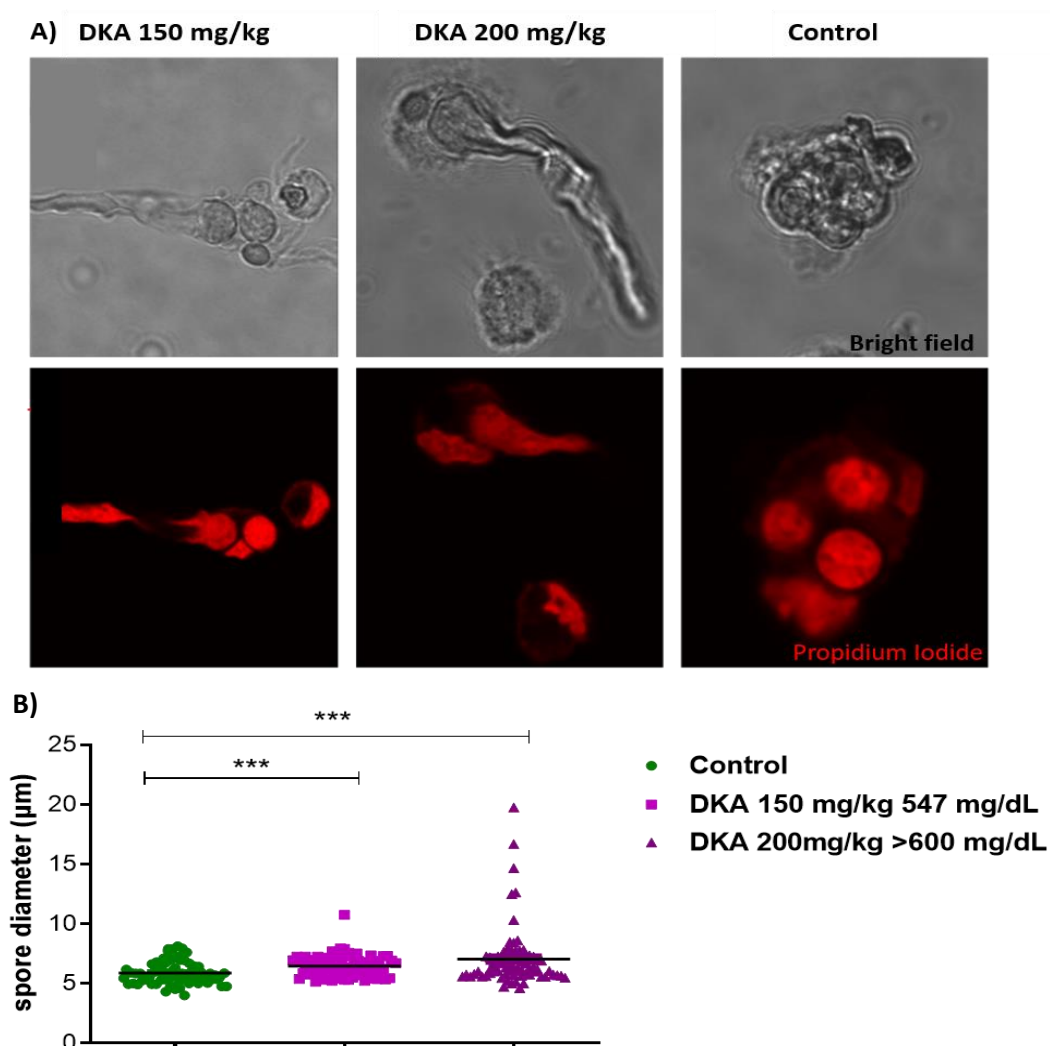
<b>Streptozotocin treated mice 150 mg/kg</b>	<b>Blood Glucose measured (1 week after streptozotocin treatment)</b>	<b>Ketones measured (1 week after streptozotocin treatment)</b>
Mouse 1	547 mg/dL	15 mmol/L
Mouse 2	> 600 mg/dL	15 mmol/L
<b>Streptozotocin treated mice 200 mg/kg</b>		
Mouse 1	> 600 mg/dL	15 mmol/L
Mouse 2	543 mg/dL	1,5 mmol/L
<b>Control mouse</b>	181 mg/dL	-

Στη συνέχεια, τα ποντίκια αυτά μολύνθηκαν από την τραχεία με  $2 \times 10^6$  κονίδια του μύκητα *Rhizopus delemar*. Κυψελιδικά μακροφάγα από τους πνεύμονες των ποντικών αυτών απομονώθηκαν 6 ώρες μετά τη μόλυνση και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 18 Α**, οι ενδοκυττάριοι μύκητες εκβλαστάνουν μέσα από τα μακροφάγα κύτταρα οδηγώντας στην ανάπτυξη διηθητικής λοίμωξης, στην περίπτωση των κυψελιδικών μακροφάγων που απομονώθηκαν από διαβητικά οξεωτικά ποντίκια. Το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρείται στην περίπτωση των κυψελιδικών μακροφάγων που απομονώθηκαν από υγιή ποντίκια. Τα φυσιολογικά

μακροφάγα διατηρούν την ικανότητά τους να περιορίζουν την ανάπτυξη του ενδοκυττάριου μύκητα.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα οξεωτικών ποντικών χάνουν την ικανότητα περιορισμού του ενδοκυττάριου μύκητα, μέσω άγνωστων μηχανισμών. Η μέτρηση της διαμέτρου των ενδοκυττάριων σπορίων που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 18 Β** ενισχύει την πεποίθηση αυτή. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται μια αρκετά σημαντική αύξηση στο μέγεθος των ενδοκυττάριων μυκήτων στην περίπτωση των μακροφάγων κυττάρων από διαβητικά οξεωτικά ποντίκια σε σχέση με τα υγιή ποντίκια.



**Εικόνα 18.** Κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα απομονωμένα από διαβητικά οξεωτικά και φυσιολογικά C57BL/6 ποντίκια μολυσμένα με  $2 \times 10^6$  κονίδια του μύκητα *Rhizopus delemar*. A) Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού των μολυσμένων κυττάρων B) αποτελέσματα μέτρησης της διαμέτρου των κονιδίων.

Με βάση την παραπάνω ανάλυση προκύπτει το συμπέρασμα πως η οξέωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη λοίμωξης από το μύκητα *Rhizopus*.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο φαινότυπος αυτός, πραγματοποιήθηκε και μόλυνση μακροφάγων από μυελό των οστών διαβητικών οξεωτικών και φυσιολογικών ποντικών. Από την ανάλυση του πειράματος δεν προέκυψε κάποια διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και των διαβητικών κυττάρων καθώς δεν υπήρξε ενδοκυττάρια ανάπτυξη του μύκητα γεγονός που υποδηλώνει πως η διαβητική οξέωση που προκαλείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου streptozotocin δεν επιδρά επιγενετικά.

Όπως αναφέρθηκε αρκετές φορές, ο σίδηρος διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη λοίμωξης από το μύκητα *Rhizopus*. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της διαβητικής κετοοξέωσης, ο μηχανισμός που έχει προταθεί περιλαμβάνει την πρωτονίωση της τρανσφερίνης και την επακόλουθη απελευθέρωση σιδήρου<sup>17</sup>. Ο σίδηρος αυτός αποτελεί διαθέσιμη πηγή για το παθογόνο που αναπτύσσεται με ταχύτατους ρυθμούς σε περιβάλλον περίσσειας σιδήρου.

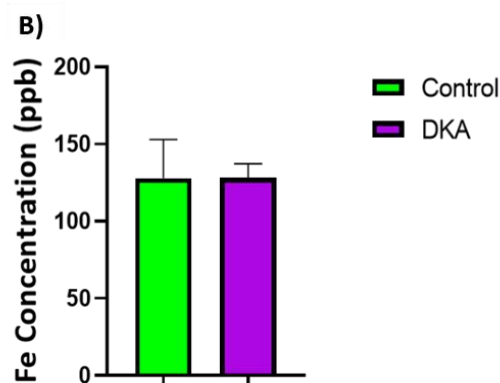
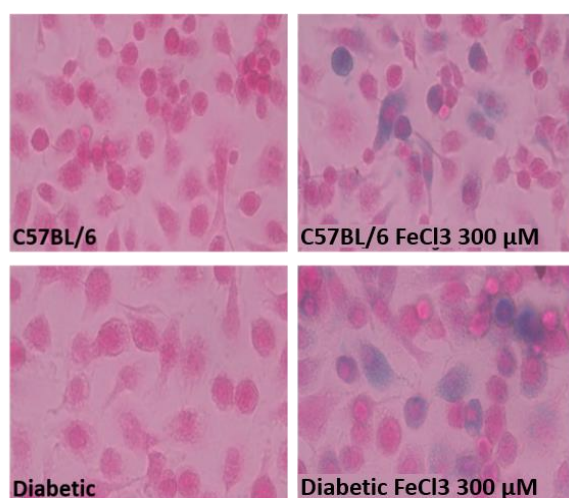
Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα συσσώρευσης διαθέσιμου σιδήρου στα μακροφάγα κύτταρα διαβητικών οξεωτικών ποντικών που θα μπορούσε να ευνοήσει την ανάπτυξη του ενδοκυττάριου μύκητα, μετρήθηκε η συγκέντρωση σιδήρου στα ίδια μακροφάγα από μυελό των οστών με τη μέθοδο του ICP-MS και πραγματοποιήθηκε παράλληλα και χρώση για σίδηρο με το αντιδραστήριο Perl's.

Στην **Εικόνα 19 A** παρουσιάζεται η χρώση Perl's σε μακροφάγα κύτταρα, φυσιολογικών και διαβητικών οξεωτικών ποντικών, επωασμένα ή μη με τρισθενή σίδηρο. Ο σίδηρος σημαίνεται με την ύπαρξη του μπλε χρώματος στις εικόνες. Όπως μπορεί να γίνει εμφανές, τόσο τα φυσιολογικά μακροφάγα όσο και τα μακροφάγα από διαβητικά οξεωτικά ποντίκια που δεν έχουν επωαστεί με σίδηρο δεν παρουσιάζουν συσσώρευση σιδήρου. Σε περίπτωση επώασης των κυττάρων με σίδηρο παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις μακροφάγων κυττάρων συσσώρευση σιδήρου.



Η απουσία συσσώρευσης σιδήρου, στα μακροφάγα κύτταρα διαβητικών οξεωτικών ποντικών, επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με τη μέτρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης σιδήρου με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS). Στην **Εικόνα 19 Β** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης, όπου καθίσταται φανερό πως τα επίπεδα σιδήρου στα μακροφάγα μυελού των οστών διαβητικών οξεωτικών ποντικών δε διαφοροποιούνται σε σχέση με εκείνα που έχουν απομονωθεί από φυσιολογικά ποντίκια.

A)



**Εικόνα 19. Μακροφάγα κύτταρα από μυελό των οστών διαβητικών C57BL/6 (DKA) και υγιών ποντικών υπερφορτωμένα για 24 ώρες με  $FeCl_3$  300  $\mu M$  A) Perl's Staining για τρισθενή σίδηρο B) Μέτρηση ολικού σιδήρου σε μακροφάγα με τη μέθοδο ICP-MS.**

Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί πως σημαντική θα ήταν και η μέτρηση της συγκέντρωσης του σιδήρου σε κυψελιδικά μακροφάγα απομονωμένα από διαβητικά οξεωτικά ποντίκια καθώς η διαβητική κετοοξέωση, που προκαλείται από το αντιδραστήριο streptozotocin, μπορεί να είναι αναστρέψιμη και να μην προκαλεί επιγενετικές βλάβες.

Από την ανάπτυξη του μοντέλου διαβητικής κετοοξέωσης προέκυψε το ερώτημα, εάν υπάρχει στην πραγματικότητα απελευθέρωση σιδήρου από την τρανσφερίνη σε κυτταρικό επίπεδο σε αυτές τις συνθήκες ή υπάρχει κάποια άλλη μεταβολική διαταραχή των κυττάρων που οδηγεί σε διηθητική λοίμωξη.

### 3.4 Μέθοδος SEC-ICP MS για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σιδήρου και ανίχνευση ανόργανων μορφών σιδήρου

#### 3.4.1 SEC συνδεδεμένη σε αντλία υγρής χρωματογραφίας

Από τα παραπάνω πειράματα προκύπτουν αρκετά ερωτήματα για τη μορφή του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά και για το αποτέλεσμα που έχει η οξείωση στην ενδοκυττάρια κινητοποίηση του σιδήρου. Προκειμένου να μπορέσουν να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά αλλά και να γίνει πλήρως κατανοητός ο ρόλος του σιδήρου στη μικορμύκωση κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού και ταυτοποίησης των διαφορετικών ειδών σιδήρου στο κύτταρο.

Η πρώτη προσπάθεια έγινε με τη μέθοδο SEC-ICP MS, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού συζευγμένη με φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένο πλάσματος. Με βάση προηγούμενες δημοσιεύσεις διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης μετάλλων συναρμοσμένων σε πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε μια στήλη μοριακού αποκλεισμού, τα χαρακτηριστικά της οποίας αναλύθηκαν παραπάνω. Στη συγκεκριμένη πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκε μια αντλία υγρής χρωματογραφίας όπου στη μία γραμμή συνδέθηκε η κινητή φάση  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5 M pH ~ 7. Στην αντλία συνδέθηκε και το σύστημα εισαγωγής του δείγματος με τις θέσεις φόρτωσης και έγχυσης του δείγματος. Όπως έχει ήδη περιγραφεί, στο σύστημα εισαγωγής βρίσκεται συνδεδεμένη και η χρωματογραφική στήλη η οποία καταλήγει στον εκνεφωτή του φασματόμετρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.

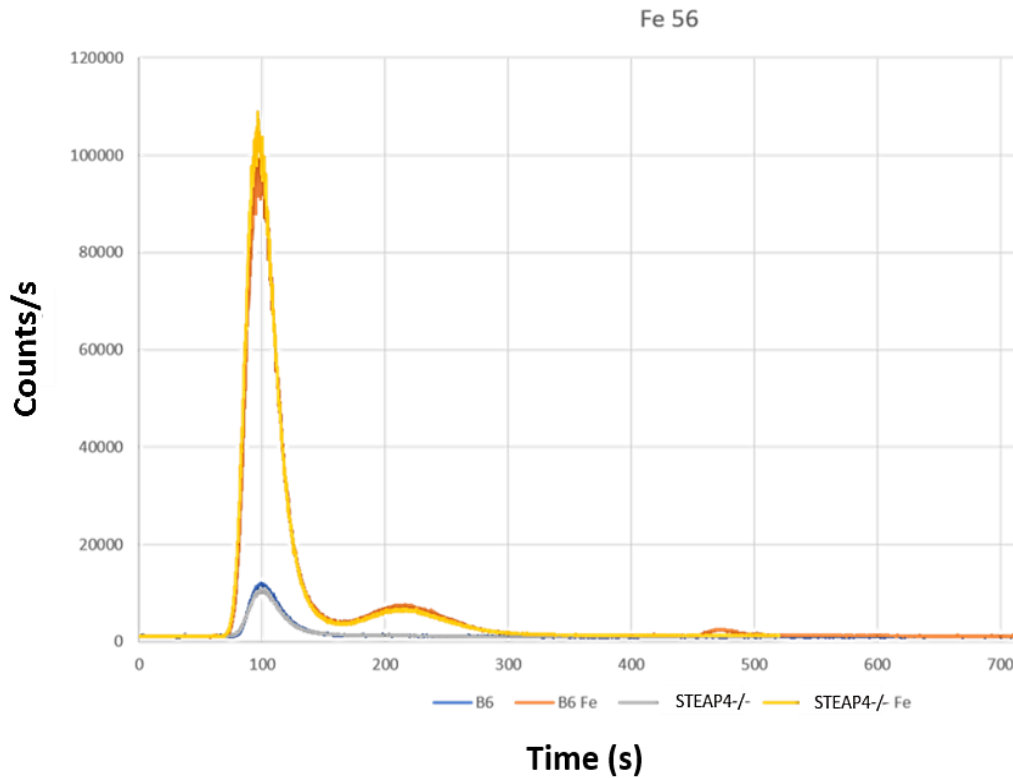
Η κινητή φάση που επιλέγεται πρέπει να είναι συμβατή τόσο με τις προς ανάλυση πρωτεΐνες, δηλαδή να μην επηρεάζει τη δομή τους, αλλά και με το ICP-MS. Από τη βιβλιογραφία οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι κυρίως TRIS-HCl,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  σε pH περίπου 7 όπου οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερές<sup>24,27,42,44,61,62</sup>.

### Ανάλυση Μακροφάγων Κυττάρων Ποντικών C57BL/6 και STEAP4-/-

Η πρώτη ανάλυση περιλαμβάνει μακροφάγα κύτταρα μυελού των οστών απομονωμένα από φυσιολογικούς C57BL/6 (B6) αλλά και διαγονιδιακούς ποντικούς STEAP4-/- . Μετά τη χρωματογραφική ανάλυση προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 20**. Από την ανάλυση προκύπτουν δυο χρωματογραφικές κορυφές, που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες/μόρια σιδήρου, ανά δείγμα κυττάρων επωασμένα για 24 ώρες με σίδηρο (B6 Fe, STEAP4-/- Fe) και μία χρωματογραφική κορυφή για τα φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με σίδηρο (B6, STEAP4-/-).

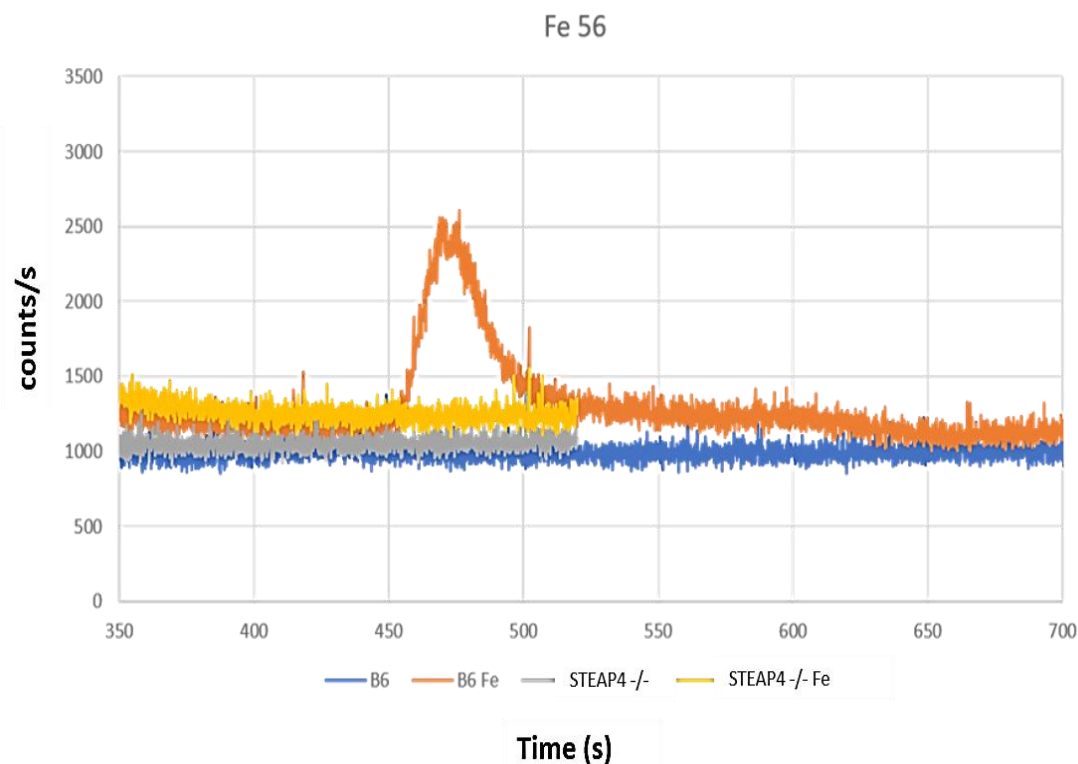
Για την πρώτη κορυφή που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα στα δείγματα κυττάρων που έχουν επωαστεί με σίδηρο, ξεκινά η έκλυση της από τα 70 s και ολοκληρώνεται στα 150 s φτάνοντας στην υψηλότερη ένταση στα 100 s. Η κορυφή αυτή αποδίδεται σε πρωτεΐνες σιδήρου μεγάλου μοριακού βάρους (>5.000 Da) που δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης και εκλύονται λίγο μετά τον κενό όγκο της στήλης που σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της στήλης αντιστοιχεί στο 1,5 mL. Η ένταση της κορυφής αντιστοιχεί σε 109.000 counts/s για τα B6 Fe κύτταρα και στα 95.000 counts/s για τα STEAP4-/- Fe κύτταρα.

Εν συνεχεία, ξεκινά η έκλυση μίας δεύτερης κορυφής από τα 170 s έως τα 290 s που φτάνει στην υψηλότερη συγκέντρωσή της στα 220 s περίπου. Η ένταση της κορυφής αυτής αντιστοιχεί σε 7.000 counts/s στην περίπτωση των B6 Fe και 6.500 counts/s στην περίπτωση των STEAP4-/- Fe. Με ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 1 mL/ min ρυθμισμένη στην αντλία υγρής χρωματογραφία υπολογίζεται πως για την έναρξη της έκλυσης της δεύτερης αυτής κορυφής καταναλώνονται περίπου 2,8 mL κινητής φάσης. Με την ολοκλήρωση της έκλυσης έχουν περάσει περίπου 5 mL κινητής φάσης. Η κορυφή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε ενώσεις σιδήρου μοριακού βάρους <5.000 Da.



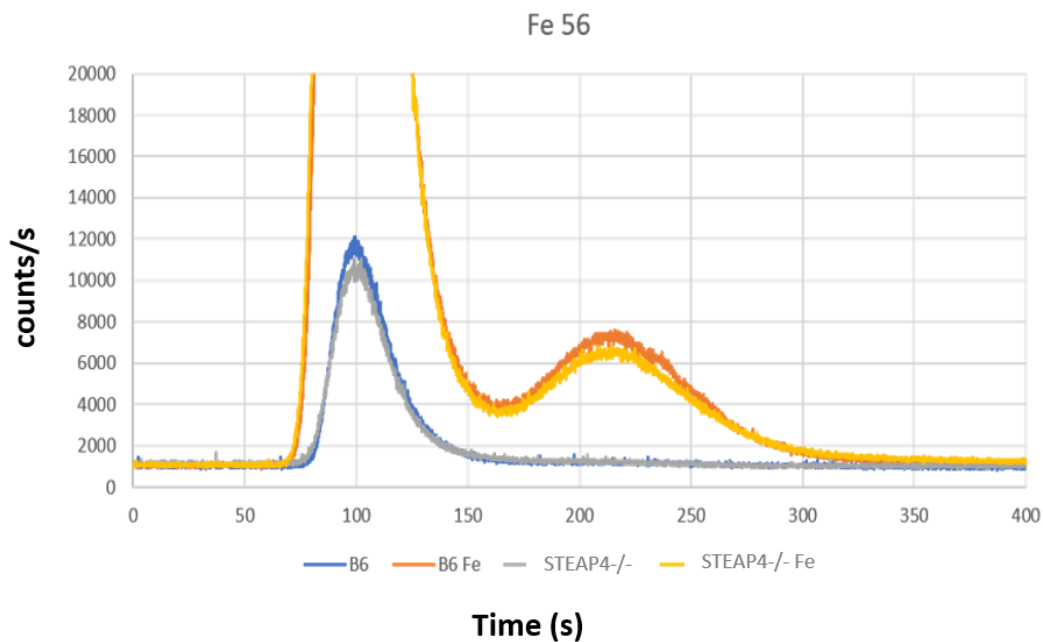
**Εικόνα 20.** Χρωματογράφημα δείγματος μακροφάγων κυττάρων από C57BL/6 και STEAP4<sup>-/-</sup> ποντικούς επωασμένα ή μη για 24 ώρες με FeCl<sub>3</sub> 300 μM.

Από τα 450 s έως τα 500 s εκλούεται μια τρίτη κορυφή στο δείγμα κυττάρων B6 Fe με υψηλότερη ένταση τα 2.500 counts/s στα 470 s (**Εικόνα 21**). Η κορυφή αυτή πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί σε ενώσεις σιδήρου χαμηλού μοριακού βάρους (< 1.000 Da) που αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη στήλη και η έκλουσή τους ξεκινάει μετά το πέρας 3,5 mL κινητής φάσης, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της στήλης, και ολοκληρώνεται στα 8,3 mL.



**Εικόνα 21.** Χρωματογράφημα δείγματος μακροφάγων κυττάρων από C57BL/6 και STEAP4-/- ποντικούς επωασμένων για 24 ώρες με  $FeCl_3$  300  $\mu M$ .

Όσον αφορά στα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με σίδηρο, στα B6 η πρώτη κορυφή, όπως φαίνεται και στην μεγεθυμένη **Εικόνα 22**, εκλούεται από τα 80 s έως τα 150 s φτάνοντας σε ένταση 12.000 counts/s στα 100 s. Όπως και στην περίπτωση των επωασμένων κυττάρων η κορυφή αυτή αποδίδεται σε πρωτεΐνες σιδήρου μεγάλου μοριακού βάρους (> 5.000 Da) που δεν αλληλεπιδρούν με τη χρωματογραφική στήλη. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και για τα κύτταρα STEAP4-/- με μοναδική διαφορά την ένταση της κορυφής ( 10.000 counts/s ). Σε αντίθεση με τα επωασμένα με σίδηρο κύτταρα δεν παρατηρούνται άλλες κορυφές. Η αναλυτική πορεία ακολουθήθηκε για ένα πειραματικό σετ κυττάρων.



**Εικόνα 22.** Χρωματογράφημα δείγματος μακροφάγων κυττάρων από C57BL/6 και STEAP4-/- ποντικούς επωασμένων για 24 ώρες με  $FeCl_3$  300  $\mu M$ .

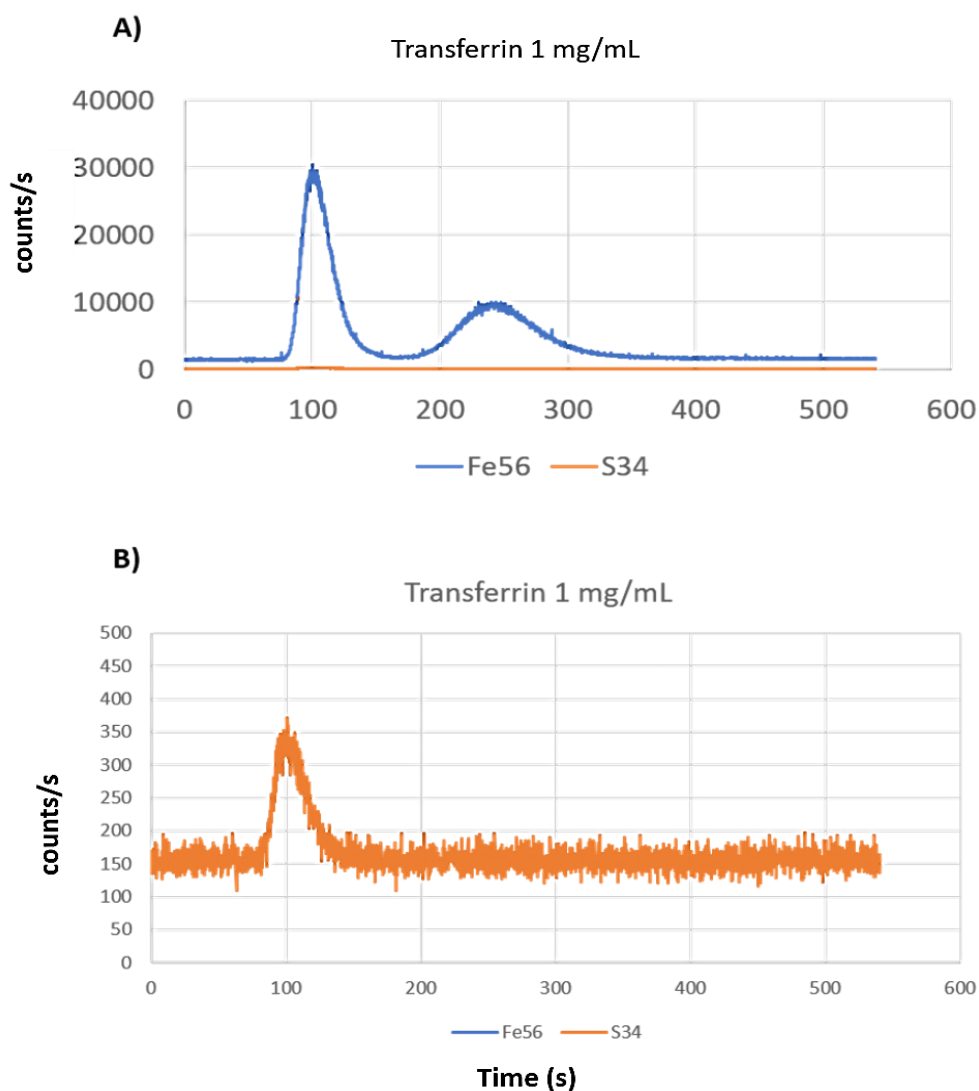
Τα αποτελέσματα της πειραματικής αυτής πορείας αποδεικνύουν τη δυνατότητα διαχωρισμού των ενώσεων σιδήρου μεγάλου μοριακού βάρους από τις αντίστοιχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους σε μακροφάγα κύτταρα. Επιπλέον, καθίσταται φανερό πως με την επώαση των κυττάρων με σίδηρο, αυξάνεται η ένταση της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί σε ενώσεις σιδήρου μεγάλου μοριακού βάρους (> 5.000 Da) αλλά εμφανίζεται και μία κορυφή που αντιστοιχεί σε ενώσεις σιδήρου μοριακού βάρους < 5.000 Da, ένδειξη για την κατανομή του σιδήρου στα κύτταρα.

Στα κύτταρα υπάρχουν ως επί το πλείστον τριών ειδών πρωτεΐνες σιδήρου. Πρωτεΐνες που προσδέουν αίμη, πρωτεΐνες σιδήρου-θείου αλλά και πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόσδεση, μεταφορά (τρανσφερίνη) και αποθήκευση τρισθενούς σιδήρου (φερριτίνη)<sup>63</sup>. Σαν πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε η τρανσφερίνη, μοριακού βάρους 80 kDa, σε συγκέντρωση 1 mg/mL κορεσμένη σε σίδηρο.

Προκειμένου να μπορέσει να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη πρωτεΐνης στην οποία βρίσκεται συνδεδεμένος ο σίδηρος προστέθηκε στην ανάλυση η παρακολούθηση του  $^{34}\text{S}$  καθώς η ανθρώπινη τρανσφερίνη διαθέτει 9 μόρια μεθειονίνης<sup>64</sup>, αμινοξύ που περιέχει θείο. Η επιλογή του  $^{34}\text{S}$  οφείλεται στην αδυναμία επιλογής του ισότοπου  $^{32}\text{S}$  με φυσική αφθονία 95,02% λόγω της ισοβαρικής παρεμπόδισης  $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$  που δημιουργείται. Το δεύτερο σε αφθονία ισότοπο αποτελεί το  $^{34}\text{S}$  (4,21%), ωστόσο λόγω της υψηλής ενέργειας ιοντισμού η ευαισθησία του ICP-MS είναι χαμηλή για το στοιχείο αυτό<sup>65</sup>. Παρόλα αυτά, αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη πρωτεϊνών.

### Ανάλυση Πρότυπων Διαλυμάτων Τρανσφερίνης, Δισθενούς και Τρισθενούς Σιδήρου

Στην **Εικόνα 23** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του δείγματος της τρανσφερίνης. Όπως και στην περίπτωση των μακροφάγων κυττάρων που είχαν επωαστεί με σίδηρο, παρατηρούνται δύο χρωματογραφικές κορυφές. Η έκλυση της πρώτης κορυφής ξεκινά στα 80 s και ολοκληρώνεται στα 150 s με την ένταση να φτάνει στο υψηλότερο σημείο στα 100 s (30.000 counts/s). Η κορυφή αυτή αποδίδεται στο μόριο της κορεσμένης με σίδηρο τρανσφερίνης καθώς στο ίδιο διάστημα παρατηρείται ( **Εικόνα 23 Β**) και η ύπαρξη κορυφής θείου.



**Εικόνα 23.** Χρωματογράφημα δείγματος τρανσφερίνης 1 mg/mL A) ολικό χρωματογράφημα B) Κορυφή που αντιστοιχεί στο θείο της τρανσφερίνης.

Η τρανσφερίνη όντας ένα μόριο με μοριακό βάρος πολύ μεγαλύτερο από τα 5000 Da (80 kDa) δεν εισέρχεται στους πόρους της στήλης και εκλούεται άμεσα.

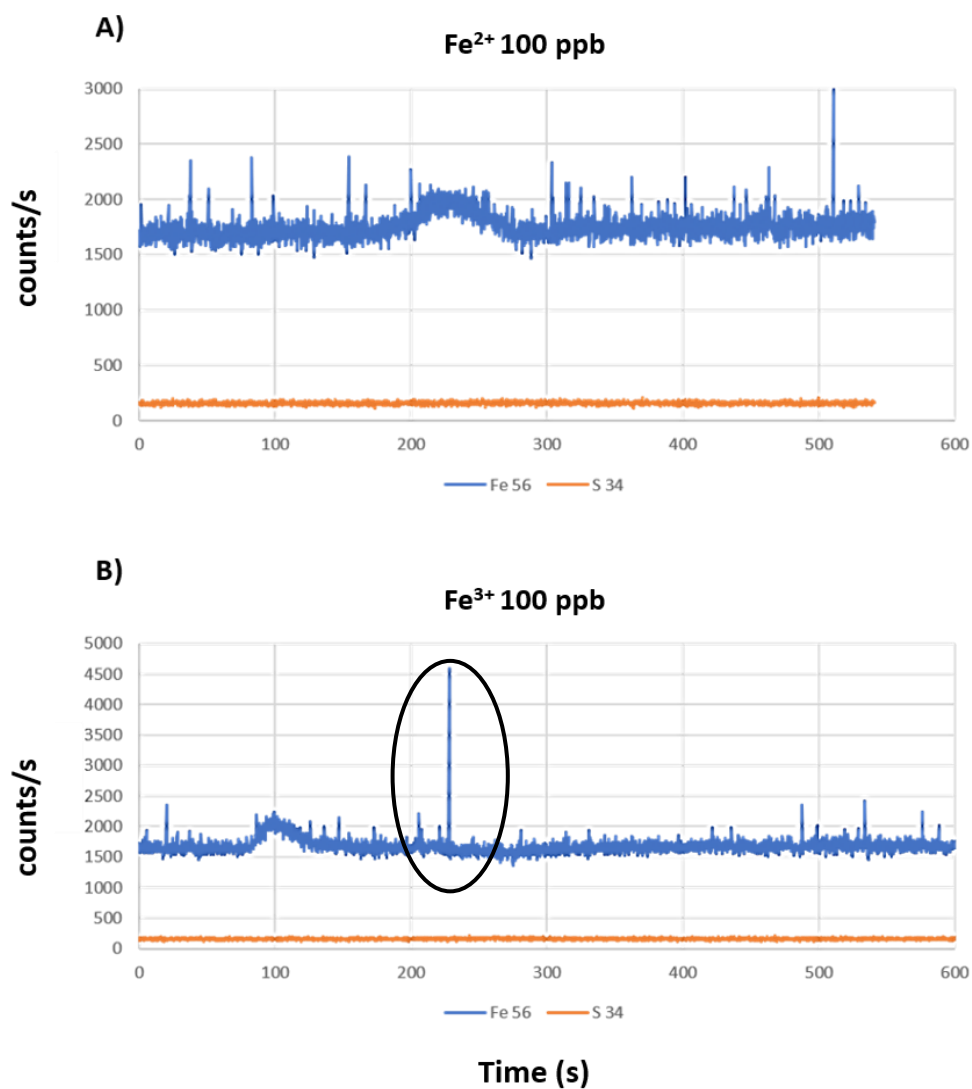
Επιπλέον, παρατηρείται μία δεύτερη κορυφή, η έκλυση της οποίας ξεκινά στα 170 s και ολοκληρώνεται στα 320 s με μέγιστη ένταση στα 240 s (10.000 counts/s). Εφόσον δεν ανιχνεύεται ποσότητα θείου στον αντίστοιχο χρόνο είναι βέβαιο πως η κορυφή αυτή δεν αντιστοιχεί σε κάποια πρωτεΐνη σιδήρου αλλά σε κάποια ένωση μοριακού βάρους < 5.000 Da όπως και στην περίπτωση των επωασμένων με σίδηρο κυττάρων.



Προκειμένου να μπορέσει να ταυτοποιηθεί η δεύτερη κορυφή σιδήρου χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα τρισθενούς και δισθενούς σιδήρου  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Mr 270,29) και  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Mr 198,81) αντίστοιχα. Τα πρότυπα διαλύματα αναλύθηκαν σε συγκέντρωση 100 ppb. Με βάση το χαμηλό μοριακό βάρος των ενώσεων (< 1.000 Da) αναμένεται η ισχυρή αλληλεπίδραση με τη στήλη και η έναρξη της έκλουσής τους σε όγκο κινητής φάσης > 3,5 mL.

Για το δισθενή σίδηρο (**Εικόνα 24 A**) εμφανίζεται μια μονή κορυφή, η έκλυση της οποίας ξεκινά από τα 190 s περίπου και ολοκληρώνεται στα 280 s περίπου. Η μέγιστη ένταση της κορυφής παρατηρείται στα 230 s με ένταση 2.000 counts/s.

Η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  100ppb (**Εικόνα 24 B**) οδήγησε στην εμφάνιση μίας κορυφής μέγιστης εντάσεως 2.000 counts/s σε χρόνο 100 s. Η έκλυση της κορυφής αυτής ξεκινά σε χρόνο 80 s και ολοκληρώνεται σε χρόνο 120 s. Ο χρόνος έκλυσης αντιστοιχεί σε μόρια/πρωτεΐνες μοριακού βάρους > 5.000 Da που δεν αλληλεπιδρούν καθόλου με τη στήλη χρωματογραφίας όπως στην περίπτωση της τρανσφερίνης.



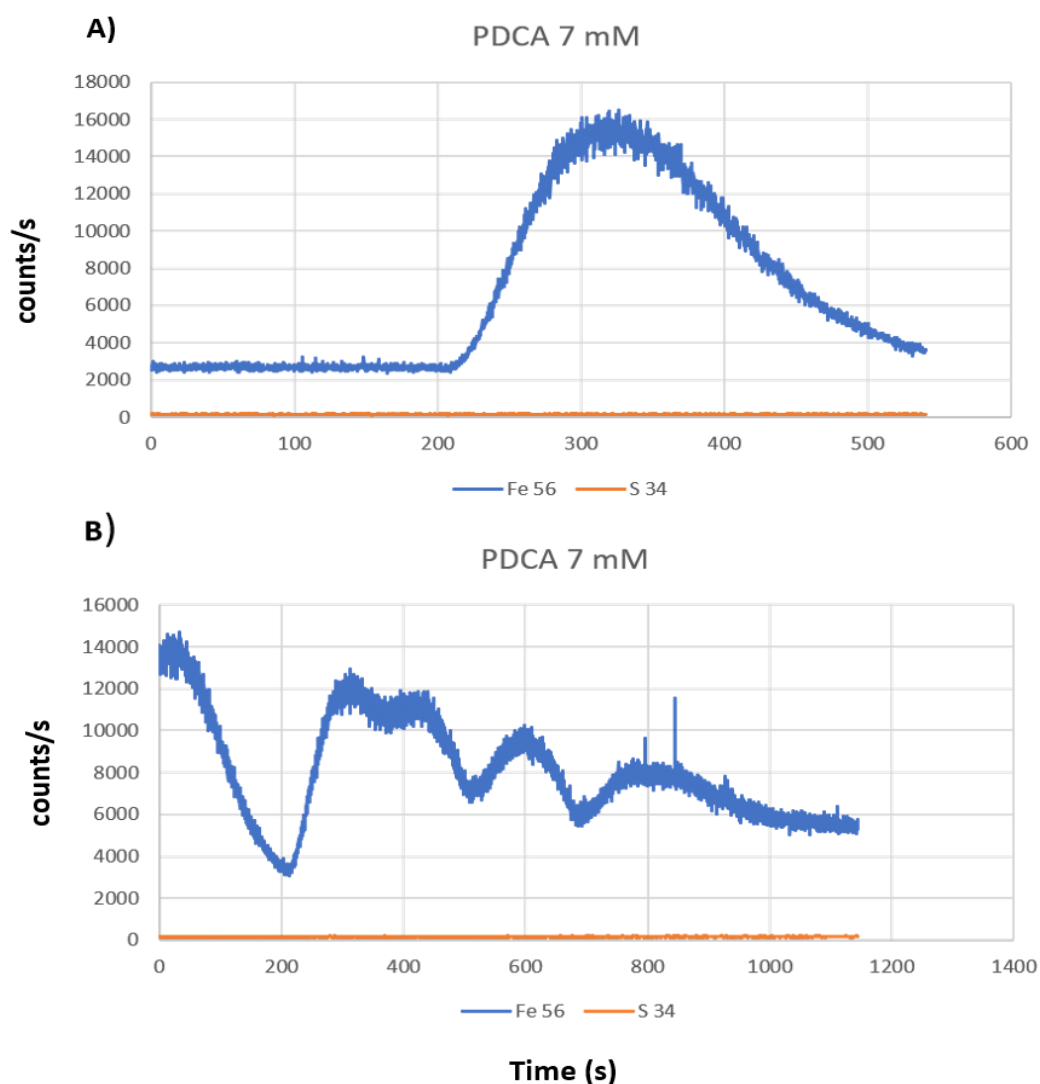
**Εικόνα 24. Χρωματογραφήματα A)  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  100 ppb και B)  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  100 ppb.**

Και για τις δύο περιπτώσεις πρότυπων διαλυμάτων σιδήρου, η ένταση των χρωματογραφικών κορυφών κρίνεται αρκετά χαμηλή καθώς και το υπόβαθρο αντιστοιχεί σε 1.500 counts/s. Το αποτέλεσμα αυτό, θα μπορούσε να αποδοθεί στην πιθανότητα αλληλεπίδρασης ή ακόμη και κατακράτησης του σιδήρου από τη χρωματογραφική στήλη ή ακόμη και στην ισχυρή αλληλεπίδραση και κατακράτηση μικρής ποσότητας τρανσφερίνης από την ανάλυση του δείγματος της τρανσφερίνης.

Με βάση τις παραπάνω σκέψεις πραγματοποιήθηκαν ενέσεις διαλύματος PDCA 7 mM που όπως συζητήθηκε και παραπάνω δημιουργεί ενώσεις τόσο με το δισθενή

όσο και με τον τρισθενή σίδηρο, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης της στήλης. Το PDCA με  $pK_{a1} \ll 0,4$ ,  $pK_{a2} = 2,10$ ,  $pK_{a3} = 4,38$  δημιουργεί ανιοντικές ενώσεις με τον δισθενή αλλά και τρισθενή σίδηρο με σταθερά σχηματισμού  $2,29 \times 10^{10}$  για το δισθενή σίδηρο και  $2,04 \times 10^{17}$  για τον τρισθενή σίδηρο<sup>26</sup>.

Όπως παρατηρείται και στην **Εικόνα 25 A)** με μία ένεση 200  $\mu$ L του PDCA 7mM (Mr 167,12) εκλούεται μια πλατιά και μεγάλης έντασης κορυφή. Η έκλουση της κορυφής αυτής ξεκινάει από τα 210 s και ολοκληρώνεται πιθανώς μετά τα 520 s φτάνοντας σε ένταση 16.000 counts/s. Επιπλέον, στην **Εικόνα 25 B)** όπου παρατίθεται το χρωματογράφημα πολλαπλών ενέσεων PDCA 7 mM παρατηρείται η διαρκής έκλουση κορυφών που αντιστοιχούν σε ενώσεις σιδήρου πιθανώς χαμηλού μοριακού βάρους < 1.000 Da. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση της έντασης των χρωματογραφικών κορυφών μετά από κάθε εισαγωγή διαλύματος PDCA, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η στήλη ήταν επιμολυσμένη από ελεύθερο σίδηρο που αλληλοεπιδρά έντονα με τη στήλη.



**Εικόνα 25. Χρωματογραφήματα A) ένεσης PDCA 7 mM B) πολλαπλών ενέσεων PDCA 7 mM.**

Ένα άλλο πρόβλημα που δημιουργήθηκε ήταν η πιθανή ύπαρξη σωματιδίων σιδήρου κατά την ανάλυση που έγινε προσπάθεια να αντιμετωπιστεί με το φιλτράρισμα του διαλύματος της κινητής φάσης με φίλτρο 0,4 μm χωρίς να υπάρχει όμως το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τα σωματίδια σιδήρου γίνονται ορατά από τα spikes που εμφανίζονται κατά τις αναλύσεις και επισημαίνονται με μαύρο κυκλικό σχήμα (Εικόνα 24 B).

### 3.4.2 SEC συνδεδεμένη στην περισταλτική αντλία του ICP-MS

Προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα της επιμόλυνσης από σωματίδια σιδήρου, από τα μεταλλικά εξαρτήματα της αντλίας, έγινε προσπάθεια ανάλυσης των δειγμάτων συνδέοντας απευθείας τη στήλη χρωματογραφίας με την περισταλτική αντλία του ICP-MS.

Το διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5 M αποτελεί ένα διάλυμα ιδιαίτερα υψηλής ιοντικής ισχύος. Από τις προηγούμενες αναλύσεις ακόμα και μετά το φιλτράρισμα του διαλύματος εξακολουθούσε η ύπαρξη σωματιδίων σιδήρου. Ένα άλλο σημείο προβληματισμού ήταν και η έκλυση του τρισθενούς σιδήρου σε χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί σε μόρια  $> 5.000$  Da. Για το λόγο αυτό, σαν κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά διαλύματα α) PDCA 10mM και β) υπερκάθαρο νερό. Το υπερκάθαρο νερό δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του δείγματος και είναι πλήρως συμβατό με τη χρωματογραφική στήλη και με το ICP-MS. Η χρήση του PDCA βασίστηκε στην ικανότητά του να δεσμεύει σίδηρο στη δισθενή αλλά και τρισθενή του μορφή προκειμένου να μην υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση του ελεύθερου σιδήρου των δειγμάτων με τη στήλη. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον Πίνακα 8.

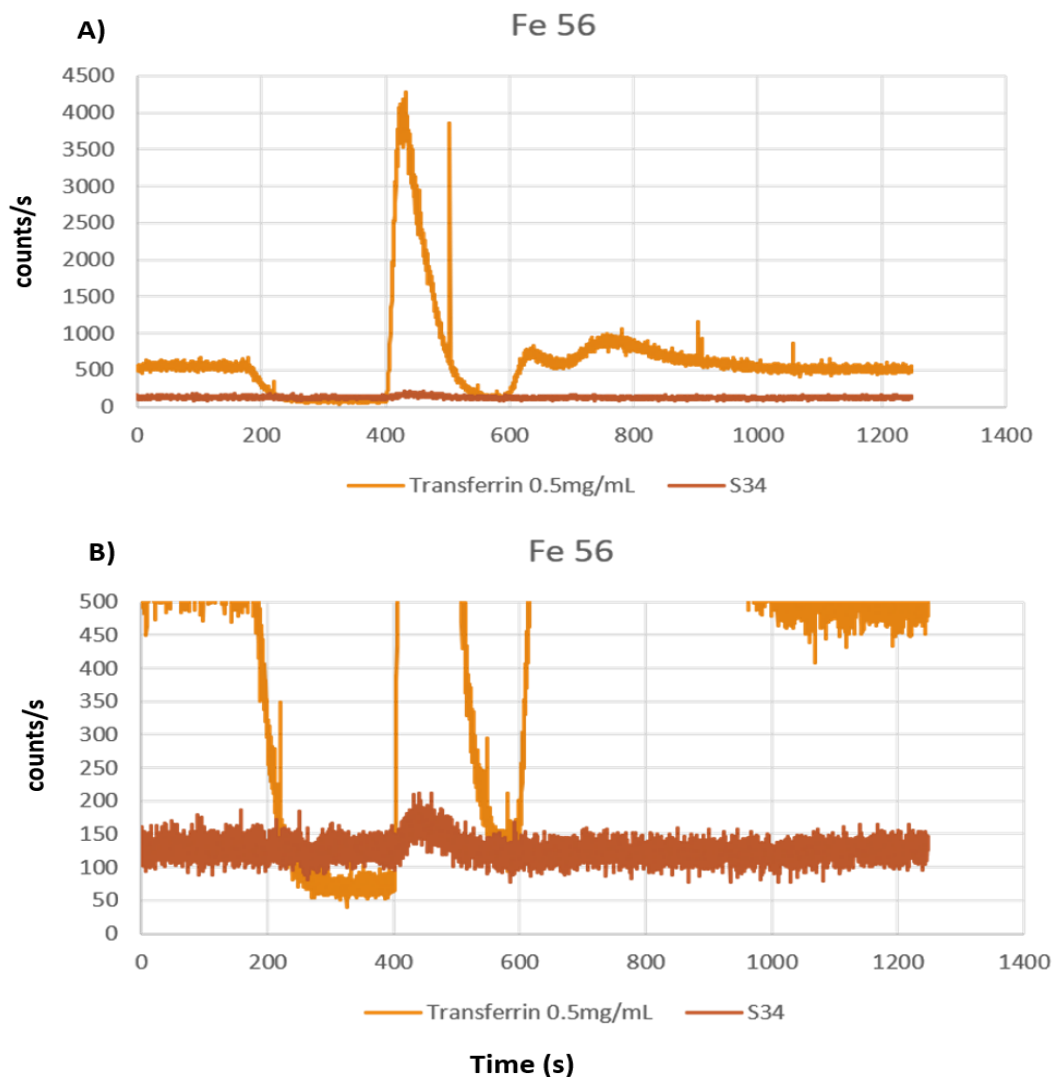
**Πίνακας 8. Μέθοδος SEC-ICP-MS**

Χρόνος (s)	H <sub>2</sub> O	PDCA 10mM	Δείγμα
0-250	√	-	-
250-265	-	-	√
265-500	-	√	-
500-1.200	√	-	-

## Ανάλυση Πρότυπων Διαλυμάτων Τρανσφερίνης, Δισθενούς και Τρισθενούς Σιδήρου

Στην πειραματική πορεία όπως αναφέρθηκε παραπάνω προστέθηκε και η μέτρηση του θείου ( $^{34}\text{S}$ ) για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε σχέση με τον ανόργανο σίδηρο. Στην ανάλυση της τρανσφερίνης 0,5 mg/mL (**Εικόνα 26 A**) προέκυψαν δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή που αντιστοιχεί στην τρανσφερίνη, με βάση την ήπια αύξησης του σήματος του  $^{34}\text{S}$ , η οποία γίνεται διακριτή στην **Εικόνα 26 B**, εκκλύεται από τα στα 400 s μέχρι τα 500 s και η έντασή της φτάνει τα 4.000 counts/s στα 430 s. Σε σχέση με την προηγούμενη αναλυτική πορεία όπου γινόταν χρήση  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  σαν κινητή φάση, στη συγκεκριμένη περίπτωση η κορυφή της τρανσφερίνης μετατοπίστηκε κατά 70 s και η έντασή της είναι φανερώς μικρότερη σε ένα μικρότερο υπόβαθρο σιδήρου που φτάνει τα 500 counts/s.

Ακολουθούν δύο πεπλατυσμένες κορυφές με μέγιστη ένταση στα 640 s και 760 s 750 counts/s και 900 counts/s αντίστοιχα. Η έκλυση της πρώτης από αυτές ξεκινάει στα 600 s και δεν ολοκληρώνεται πριν ξεκινήσει στα 700 s η έκλυση της δεύτερης κορυφής, η οποία ολοκληρώνεται περίπου στα 850 s. Σύμφωνα με τις παραπάνω αναλύσεις θα μπορούσε να θεωρηθεί πως οι κορυφές αυτές οφείλονται σε ανόργανο σίδηρο που υπάρχει σε ελεύθερη ιοντική μορφή στο πρότυπο δείγμα της τρανσφερίνης και αλληλοεπιδρά πιθανώς με το PDCA δημιουργώντας σύμπλοκα σιδήρου που η έκλυσή τους μετατοπίζεται 100 s σε σχέση με τη χρήση του διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  σαν κινητή φάση. Και σε αυτήν την περίπτωση η ένταση που παρατηρείται είναι αρκετά χαμηλότερη.



**Εικόνα 26.** Χρωματογράφημα τρανσφερίνης 0,5 mg/mL A) ολικό χρωματογράφημα B) κορυφή θείου που αντιστοιχεί στο θείο της τρανσφερίνης.

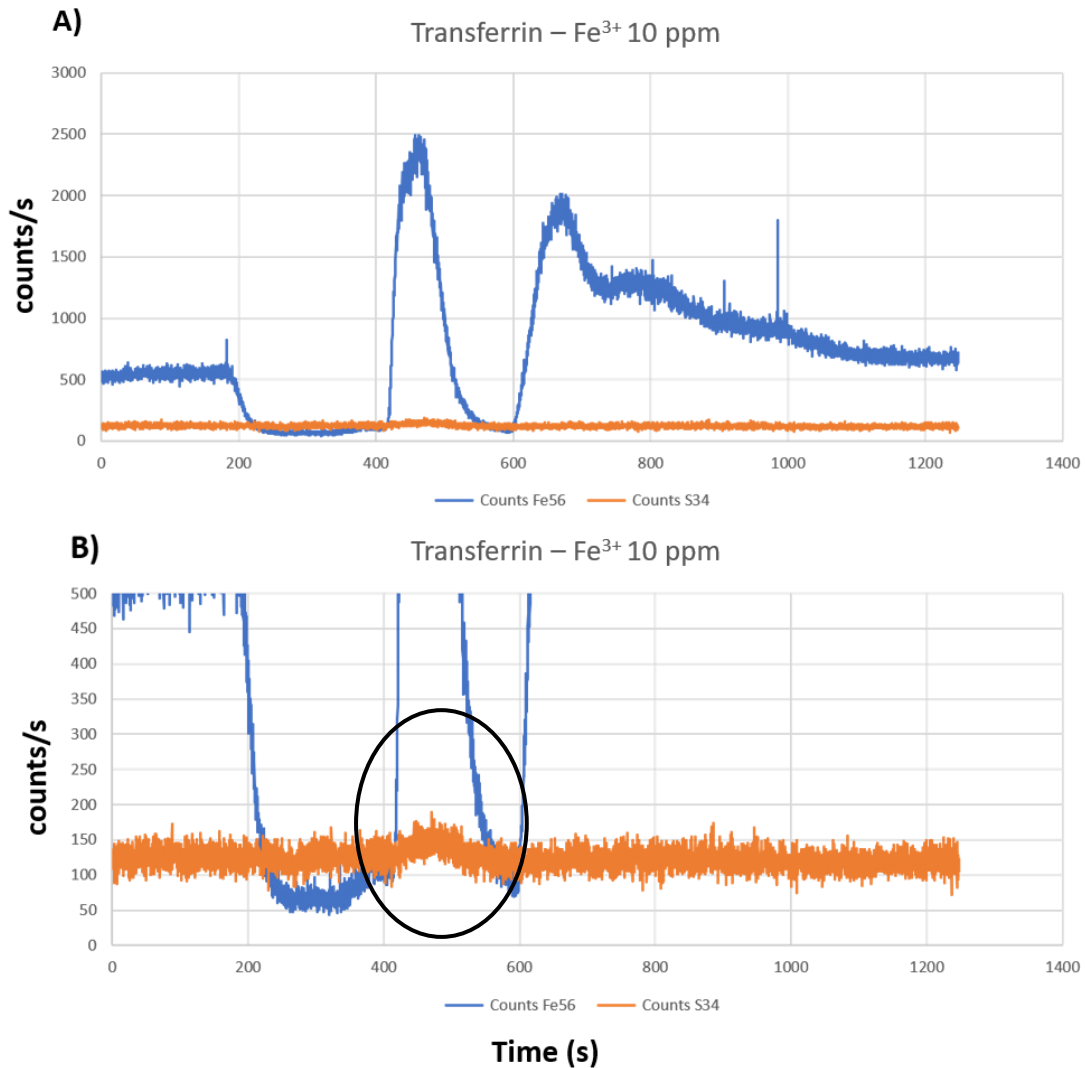
Προκειμένου οι δύο αυτές χρωματογραφικές κορυφές να αποδοθούν συγκεκριμένα στις δύο μορφές του σιδήρου δημιουργήθηκε δείγμα τρανσφερίνης 0,5 mg/mL με 10 ppm  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης (**Εικόνα 27 A**) φαίνεται πως η προσθήκη του τρισθενούς σιδήρου οδηγεί σε αύξηση της έντασης της δεύτερης και τρίτης κορυφής σε 2.000 counts/s και 1.300 counts/s αντίστοιχα. Η αύξηση της τρίτης κορυφής οφείλεται σε ένα μέρος της στη δεύτερη κορυφή καθώς δεν έχει προλάβει να εκλουστεί πλήρως. Παράλληλα, παρατηρείται και μείωση της έντασης της πρώτης

κορυφής που αντιστοιχεί στην τρανσφερίνη, από 4.000 counts/s σε 2.500 counts/s. Η μείωση αυτή μπορεί να παρατηρηθεί και στην περίπτωση του θείου (**Εικόνα 27 Β**) που η ένταση της κορυφής μειώνεται από 200 counts/s σε 150 counts/s. Συνεπώς, παρατηρείται μείωση της κορεσμένης με σίδηρο πρωτεΐνης στο δείγμα και αύξηση του ανόργανου σιδήρου του δείγματος της τρανσφερίνης. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού θα ήταν η αποδέσμευση σιδήρου από την τρανσφερίνη λόγω της οξύτητας του PDCA που αποτελεί ασθενές οξύ με  $pK_a$  3,24.

Όσον αφορά στη δεύτερη και τρίτη κορυφή, η αύξηση της έντασης αυτών υποδεικνύει πράγματι την ύπαρξη ανόργανου σιδήρου. Η μορφή των κορυφών αυτών ίσως οφείλεται σε ισχυρή κατακράτηση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από την ανάλυση πρότυπων δειγμάτων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου ίδιας συγκέντρωσης (10 ppm) όπως υποδεικνύεται και στην **Εικόνα 28**.



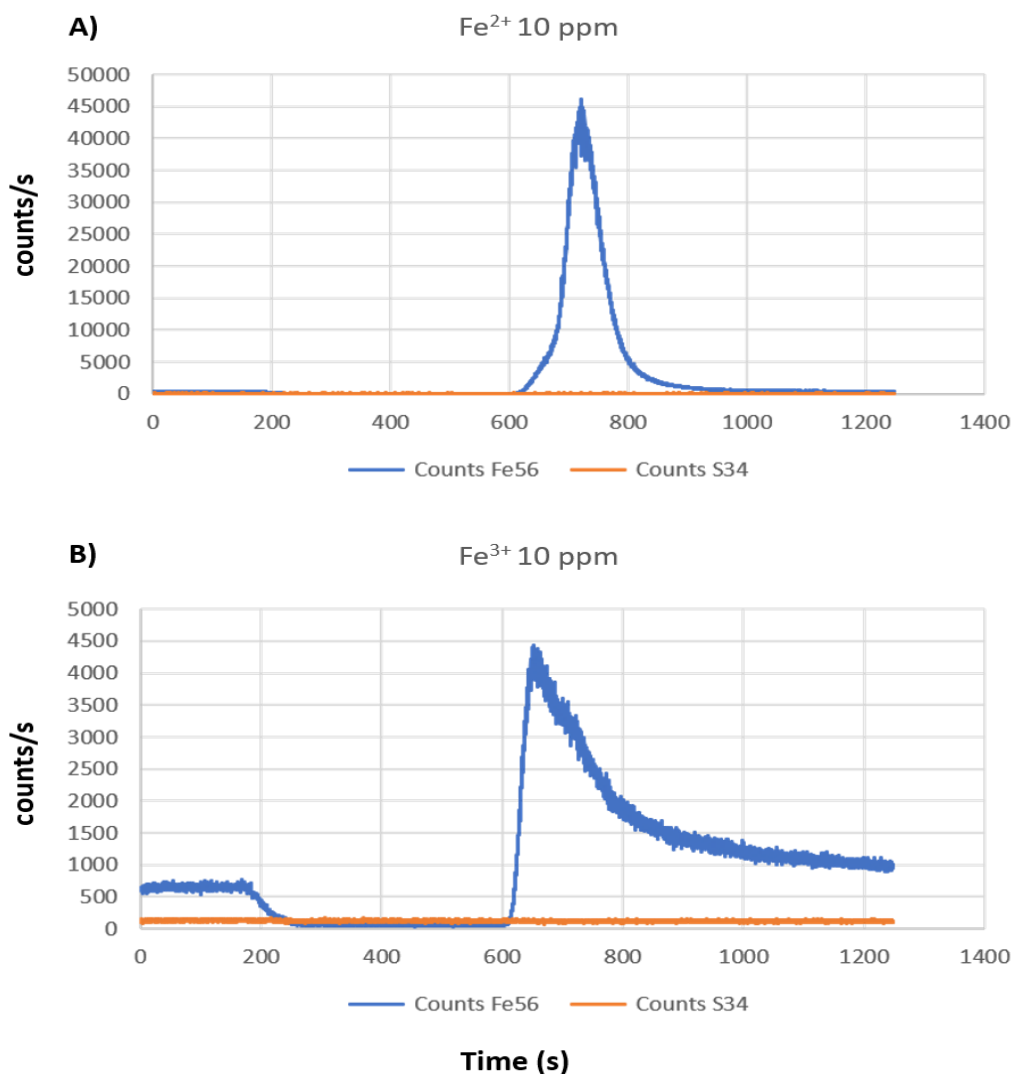


**Εικόνα 27.** Χρωματογράφημα τρανσφερίνης 0,5 mg/mL εμπλουτισμένης με FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 ppm A) ολικό χρωματογράφημα B) κορυφή θείου που αντιστοιχεί στο θείο της τρανσφερίνης.

Η ανάλυση του δισθενούς σιδήρου (**Εικόνα 28 A**) οδηγεί σε μια οξεία κορυφή, η έκλυση της οποίας ξεκινά στα 650 s και ολοκληρώνεται στα 800 s. Στα 720 s παρατηρείται η μέγιστη ένταση της κορυφής με τιμή 45.000 counts/s.

Αντίστοιχα, η ανάλυση του τρισθενούς σιδήρου (**Εικόνα 28 B**) δίνει μια πλατιά κορυφή μέγιστης εντάσεως στα 640 s που αντιστοιχεί σε 4.500 counts/s. Η ένταση αυτή είναι πολύ χαμηλή για την υψηλή συγκέντρωση σιδήρου που εισήχθη. Για τον τρισθενή σίδηρο η έκλυση της κορυφής ξεκινάει στα 610 s και δεν ολοκληρώνεται πριν το τέλος της χρωματογραφικής καταγραφής. Η ένταση αλλά και το πλάτος της

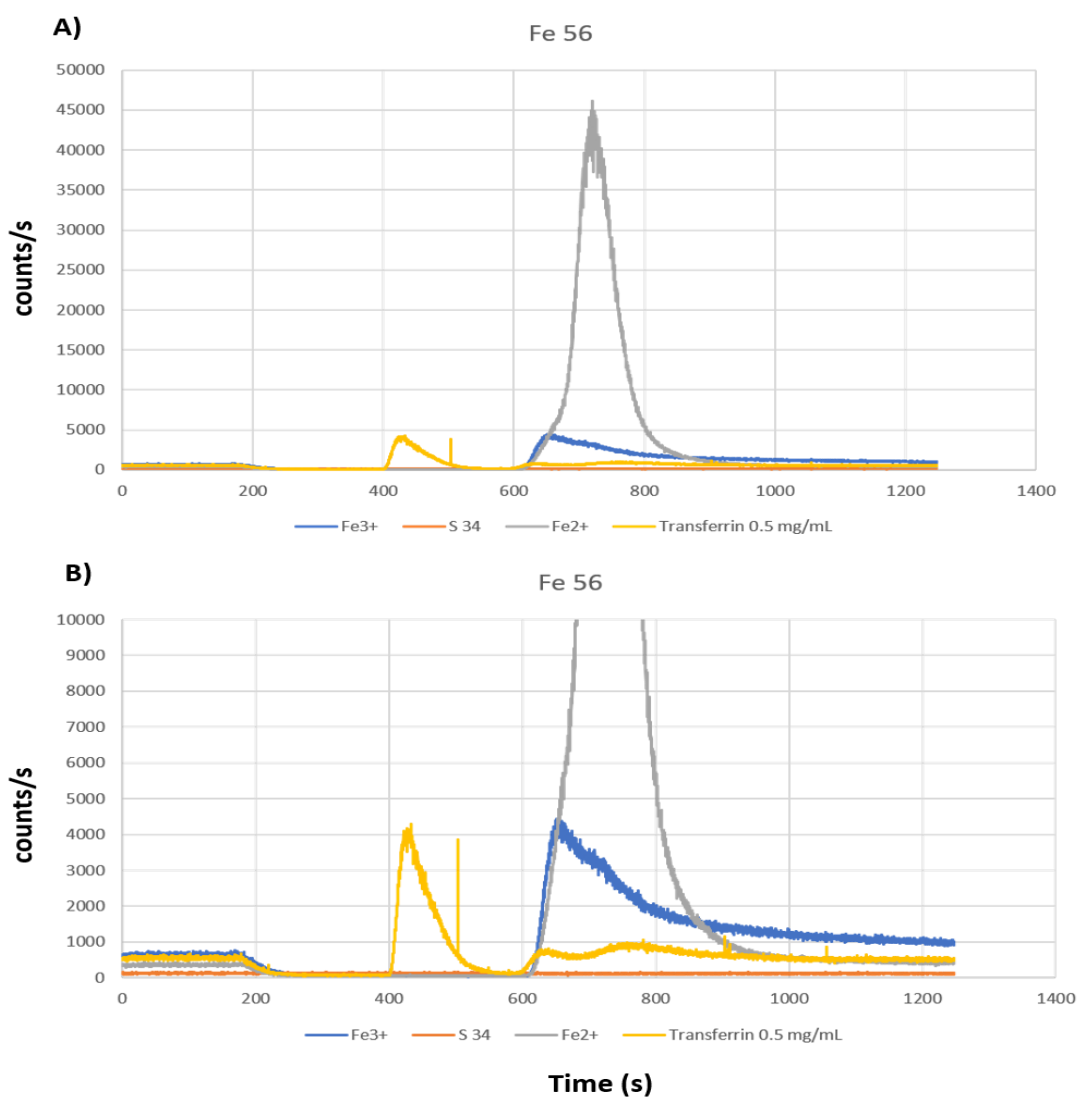
χρωματογραφικής κορυφής του πρότυπου του τρισθενούς σιδήρου μπορεί να οφείλεται σε ισχυρή αλληλεπίδραση του σιδήρου με τη στατική φάση της στήλης ή και σχηματισμό αδιάλυτων ενώσεων σιδήρου 3+.



**Εικόνα 28.** Χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων A)  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  και B)  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .

Στην **Εικόνα 29** παρουσιάζεται η επικάλυψη των χρωματογραφημάτων των δύο πρότυπων διαλυμάτων σιδήρου με αυτό της τρανσφερίνης. Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό, οι δύο τελευταίες χρωματογραφικές κορυφές που προκύπτουν από την ανάλυση του δείγματος της τρανσφερίνης δύναται να αντιστοιχούν στις δύο μορφές σιδήρου ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ). Ωστόσο, οι δυο χρωματογραφικές κορυφές των πρότυπων

διαλυμάτων σιδήρου επικαλύπτονται στο μεγαλύτερο τους βαθμό καθώς η διαφορά στο χρόνο έκλουσης μεταξύ αυτών αντιστοιχεί σε 40 s. Επιπρόσθετα, η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος τρισθενούς σιδήρου καταδεικνύει έντονη αλληλεπίδραση του σιδήρου με τη στήλη.



**Εικόνα 29.** Επικάλυψη χρωματογραφημάτων  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  και  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  με το χρωματογράφημα της τρανσφερίνης 0,5 mg/mL.

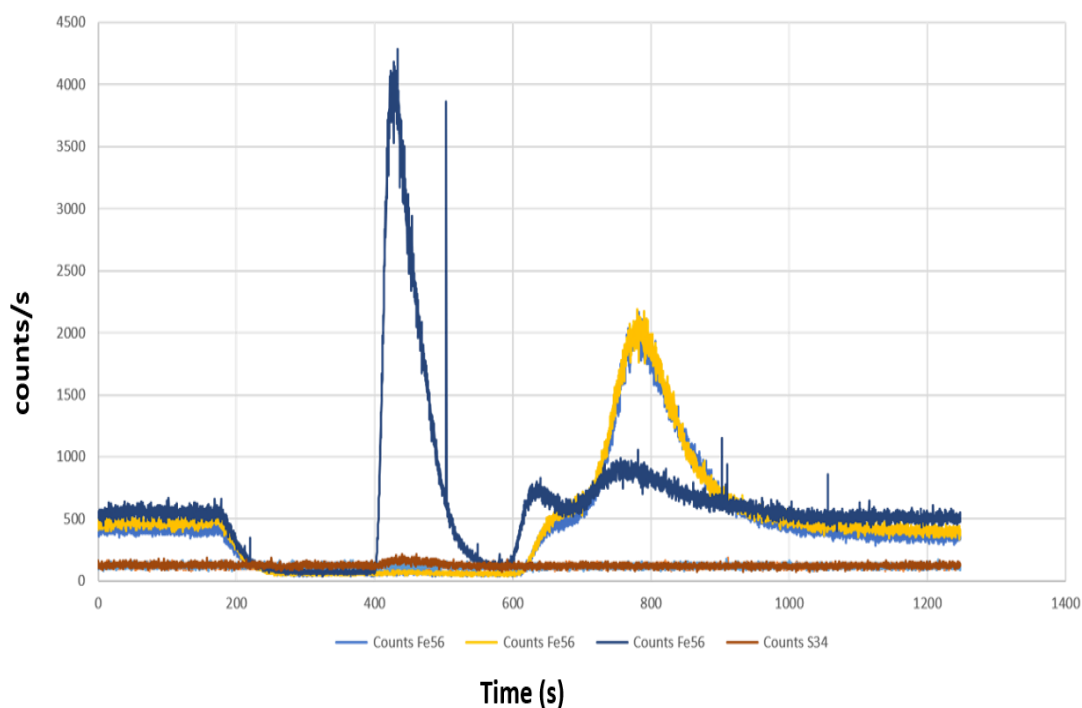
Η αντιστοίχιση των κορυφών του πρότυπου διαλύματος της τρανσφερίνης στις δύο μορφές σιδήρου αποτελεί σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου, ωστόσο δεν μπορεί να οδηγήσει σε επαρκή διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση.

### Ανάλυση Διαλυμάτων Δεφεροξαμίνης Εμπλουτισμένης με Σίδηρο και Τρανσφερίνης

Στη συνέχεια της πειραματικής πορείας έγινε προσπάθεια ανάλυσης και της δεφεροξαμίνης (Deferoxamine). Η ανάλυση μειγμάτων διαλύματος δεφεροξαμίνης με πρότυπα διαλύματα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου παρουσιάζουν τις ίδιες χρωματογραφικές κορυφές ( **Εικόνα 30**).

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις διαλυμάτων δεφεροξαμίνης στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 100 ppb και ποσότητα τρισθενούς σιδήρου με τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 100 ppb. Το μοριακό βάρος της δεφεροξαμίνης αντιστοιχεί σε 656,8 (< 1000 Da) οπότε και αναμένεται διείσδυση της στους πόρους της στατικής φάσης της στήλης. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 30** και για τα δύο διαλύματα δεφεροξαμίνης εμπλουτισμένης με σίδηρο παρατηρείται μία κύρια κορυφή που ξεκινά να εκλύεται στα 700 s και ολοκληρώνεται στα 950 s, εντάσεως 2.000 counts/s στα 770 s. Η χρωματογραφική αυτή κορυφή εκλύεται σε χρόνο παρόμοιο με αυτόν της τρίτης κορυφής του δείγματος της τρανσφερίνης. Επιπλέον, διακρίνεται και η ύπαρξη μίας κορυφής που εκλύεται από τα 620 s με ένταση 500 counts/s και δεν ολοκληρώνεται πριν την έκλυση της προαναφερθείσας χρωματογραφικής κορυφής. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο χρωματογραφικό προφίλ ανάμεσα στο διάλυμα της δεφεροξαμίνης εμπλουτισμένης με τρισθενή σίδηρο και της δεφεροξαμίνης εμπλουτισμένης και με τις δύο μορφές σιδήρου.

Transferrin 0,5mg/mL-DFO.Fe<sup>3+</sup> 100ppb-DFO.Fe<sup>2+</sup>Fe<sup>3+</sup> 100ppb



**Εικόνα 30. Επικάλυψη χρωματογραφημάτων τρανσφερίνης 0,5 mg/mL Deferoxamine 6 mM – FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 100 ppb, Deferoxamine 6 mM – FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O – FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.**

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα της αναλυτικής πορείας αποφασίστηκε η δοκιμή μίας νέας κινητής φάσης προκειμένου να γίνει προσπάθεια επαρκούς διαχωρισμού των ανόργανων μορφών του σιδήρου. Η νέα κινητή φάση περιλαμβάνει 14 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA) προκειμένου να αυξηθεί η αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τον ελεύθερο σίδηρο και να βελτιωθεί η έκλυση των ανόργανων μορφών του σιδήρου των δειγμάτων. Επιπλέον, προστέθηκαν 66 mM KOH, 74 mM HCOOH, και 5,6 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, άλας που βιβλιογραφικά χρησιμοποιείται για τη βελτίωση του διαχωρισμού ειδών μετάλλου<sup>66,67</sup>. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε περίπου στα 4,22. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 9. Μέθοδος SEC-ICP-MS**

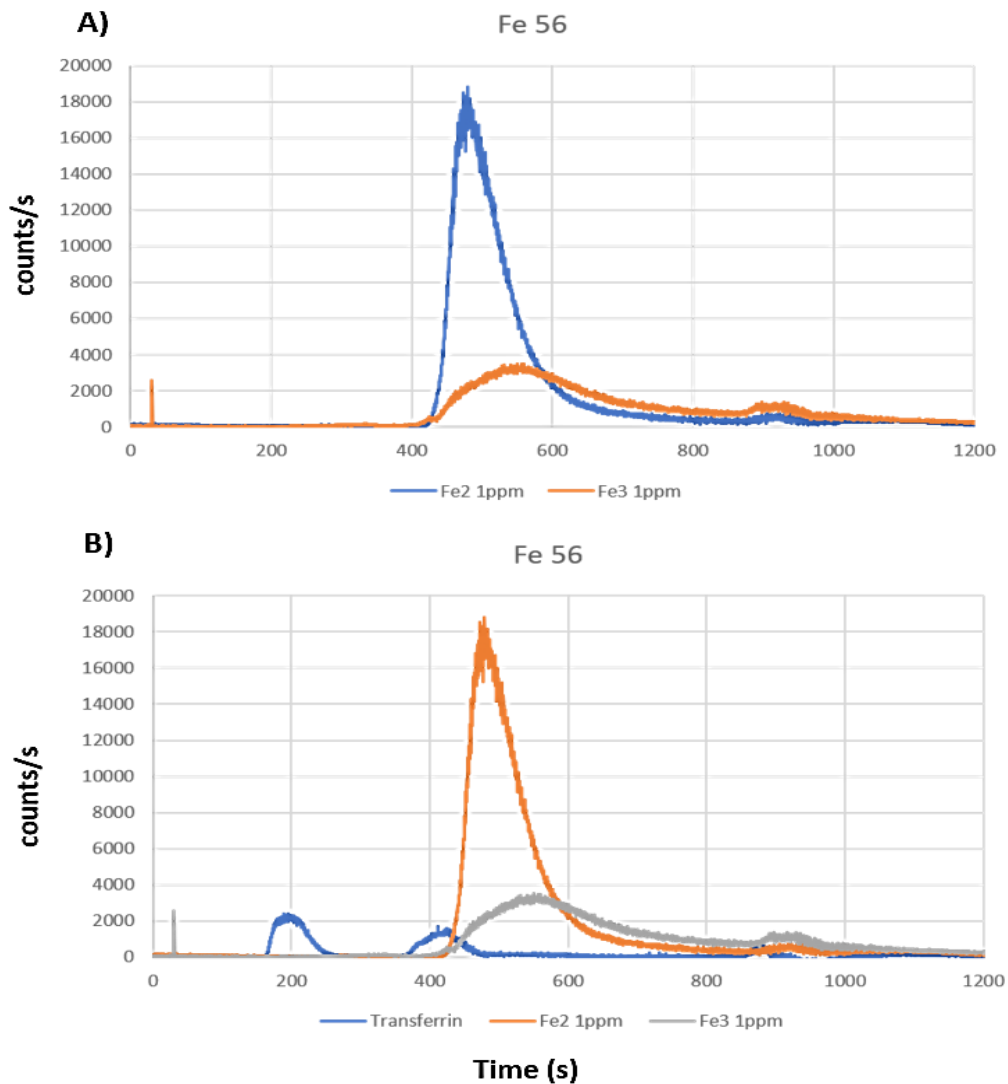
Χρόνος (s)	H <sub>2</sub> O	14 mM (PDCA) 66 mM KOH, 74 mM HCOOH, 5.6 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Δείγμα
0	-	-	✓
0- 250	✓	-	-
250-650	-	✓	-
650-1.200	✓	-	-

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται πλέον στο χρόνο  $t=0$  s προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η αλληλεπίδραση του δείγματος με το αντιδραστήριο PDCA και να ενισχυθεί η έκλυση του σιδήρου των δειγμάτων που κατακρατείται ισχυρά από τη στήλη με σκοπό την έκλυσή του σε μετέπειτα χρόνο και ενίσχυση του διαχωρισμού του στις δύο μορφές του.

*Ανάλυση Πρότυπων Διαλυμάτων Τρανσφερίνης, Δισθενούς και Τρισθενούς Σιδήρου*

Όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 31 A** η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος τρισθενούς σιδήρου με την νέα αναλυτική πορεία οδηγεί στην έκλυση μίας πλατιάς κορυφής από τα 450 s έως τα 800 s περίπου με μέγιστη ένταση 3.800 counts/s στα 550 s, ενώ το πρότυπο του δισθενούς παρουσιάζει μια κορυφή μέγιστης εντάσεως 17.000 counts/s στα 480 s. Η έκλυση της εν λόγω κορυφής ξεκινά στα 430 s και ολοκληρώνεται στα 800 s. Όπως έχει προαναφερθεί, κατά την ανάλυση του τρισθενούς σιδήρου η ένταση των χρωματογραφικών κορυφών δεν αντιστοιχεί στις εκάστοτε συγκεντρώσεις σιδήρου που εισάγονται. Επιπλέον, δε μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός μεταξύ των δύο πρότυπων μορφών σιδήρου καθώς η επικάλυψη των κορυφών τους είναι σημαντική με διαφορά στο χρόνο έκλυσης 20 s.

Το πρότυπο διάλυμα της τρανσφερίνης (**Εικόνα 31 Β**) δίνει δύο κορυφές όπως ήταν αναμενόμενο. Η έκλυση της πρώτης κορυφής ξεκινά στα 170 s και ολοκληρώνεται στα 250 s. Η υψηλότερη ένταση της κορυφής αντιστοιχεί σε ένταση 2.300 counts/s σε χρόνο 180 s. Η κορυφή αυτή σύμφωνα με τις προηγούμενες αναλύσεις αντιστοιχεί στην κορεσμένη σε σίδηρο τρανσφερίνη, ωστόσο λόγω του πολύ υψηλού υπόβαθρου που παρουσιάζει το θείο με την εν λόγω κινητή φάση δε μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ένδειξη πρωτεϊνικής ύπαρξης. Ο όγκος κινητής φάσης στον οποίο ξεκινά η έκλυση της κορυφής αυτής όμως (< 3,5 mL) αντιστοιχεί σε ενώσεις μοριακού βάρους > 5000 Da. Επιπλέον, εκλύεται και η δεύτερη κορυφή της τρανσφερίνης από τα 350 s έως τα 470 s όπου στα 450 s έχει ένταση 1.650 counts/s.



**Εικόνα 31. Επικάλυψη χρωματογραφημάτων A)  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  1 ppm –  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  1ppm B) τρανσφερίνης 0,1 mg/mL –  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  1 ppm –  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  1 ppm.**

Η παραπάνω μέθοδος οδήγησε σε αρκετά καλό διαχωρισμό της πρωτεΐνης του δείγματος της τρανσφερίνης από τις άλλες μορφές σιδήρου που υπάρχουν στο δείγμα ωστόσο δεν οδήγησε σε διαχωρισμό των δύο μορφών σιδήρου ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) σε ικανοποιητικό βαθμό.



### 3.5 Μέθοδος HILIC-ICP-MS για το διαχωρισμό ανόργανων μορφών σιδήρου

Μετά την επιτυχή προσπάθεια διαχωρισμού της πρωτεϊνικής μορφής από την ανόργανη μορφή σιδήρου στο δείγμα της τρανσφερίνης έγινε προσπάθεια διαχωρισμού των δύο μορφών σιδήρου ( $Fe^{2+}$  και  $Fe^{3+}$ ) που δεν κατέστη δυνατό με τη σύζευξη της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.

Ο μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων στη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων έχει χαρακτηριστεί ως η κατανομή των αναλυτών ανάμεσα στη στατική φάση και το υδάτινο στρώμα που δημιουργείται στην πολική επιφάνεια της στατικής φάσης. Ωστόσο ανάλογα τη στατική, κινητή φάση και τον αναλύτη δημιουργούνται και άλλου είδους αλληλεπιδράσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε διαχωρισμό<sup>68</sup>.

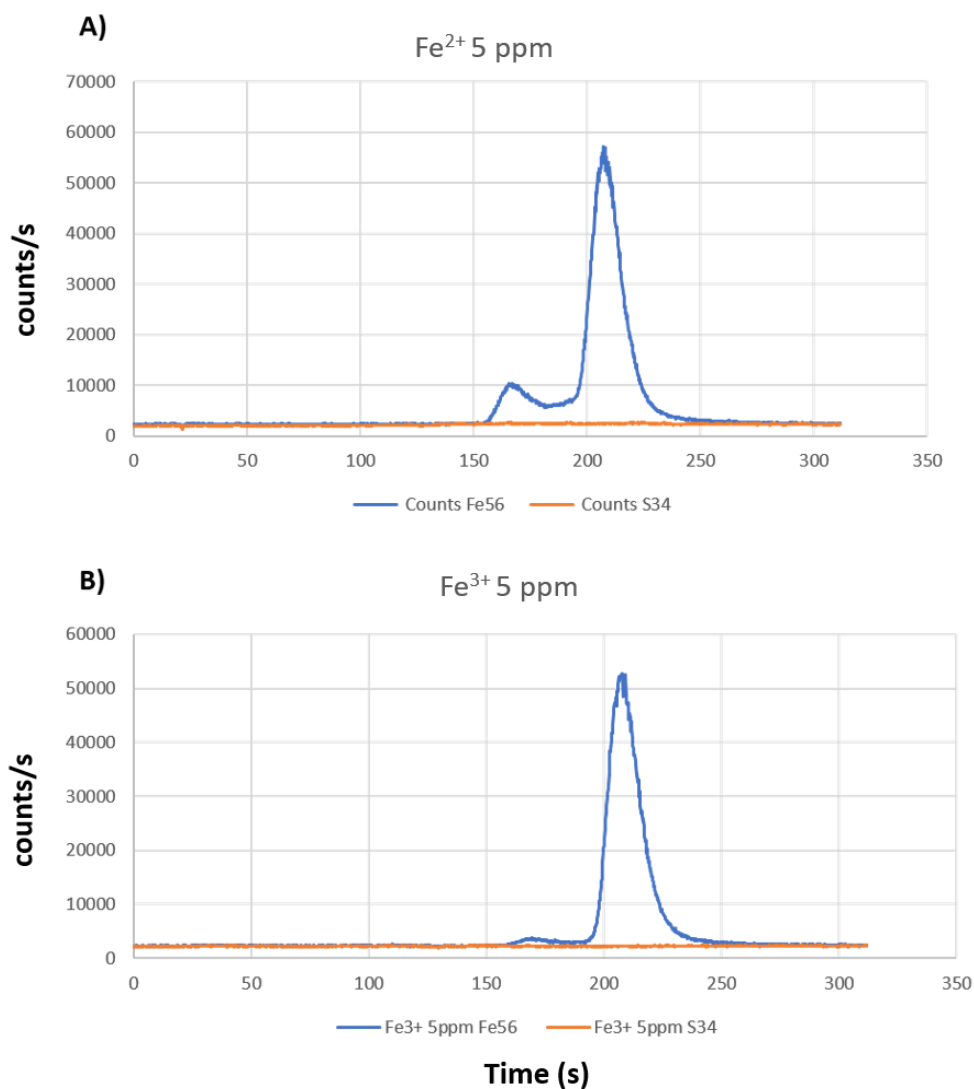
Στη συγκεκριμένη περίπτωση αναμένεται αλληλεπίδραση ιόντος – διπόλου μεταξύ των πρότυπων διαλυμάτων σιδήρου και της στατικής φάσης της στήλης. Ο διαχωρισμός των δύο μορφών σιδήρου βασίζεται στην ισχυρότερη αλληλεπίδραση της ένωσης με το μεγαλύτερο φορτίο με το στρώμα νερού στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό αναμένεται ισχυρότερη κατακράτηση του τρισθενούς σιδήρου και συνεπώς έκλουσή του μετά την έκλουση του δισθενούς σιδήρου.

#### Ανάλυση Πρότυπων Διαλυμάτων Τρανσφερίνης, Δισθενούς και Τρισθενούς Σιδήρου

Στην **Εικόνα 32** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του δισθενούς (**Εικόνα 32 A**) και τρισθενούς σιδήρου (**Εικόνα 32 B**) συγκέντρωσης 5 ppm. Στο χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  συγκέντρωσης 5 ppm δεν παρατηρείται μία αλλά δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή εμφανίζεται σε χρόνο 150 s

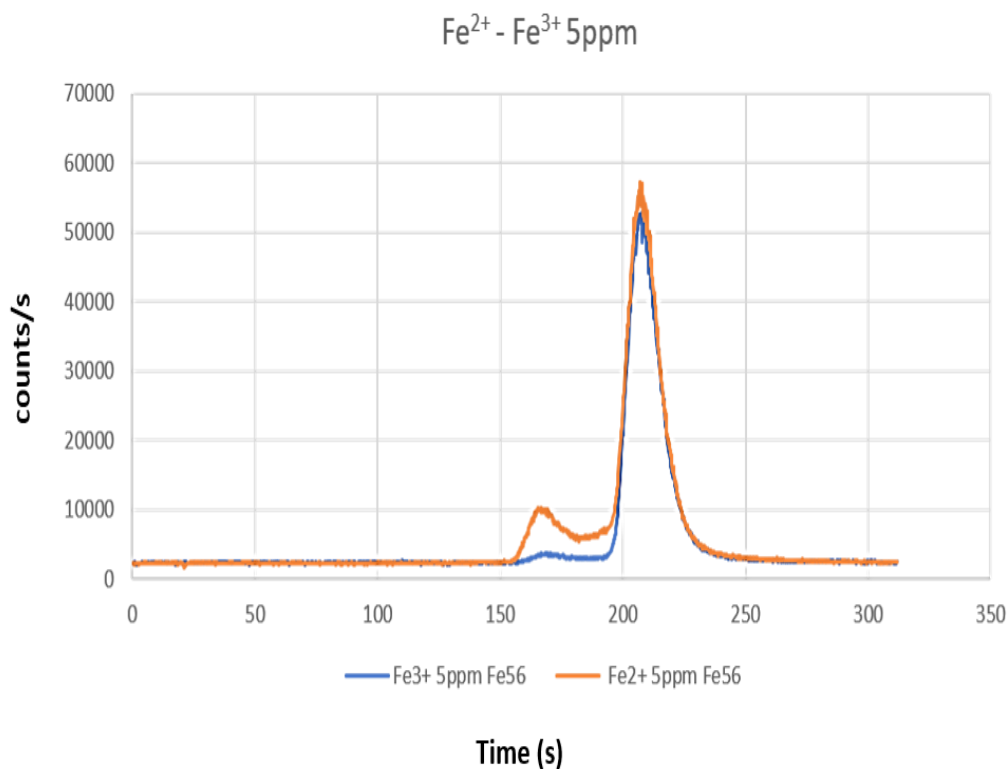
με μέγιστη ένταση 10.000 counts/s στα 165 s. Η έκλυση της κορυφής αυτής δεν ολοκληρώνεται και σε χρόνο 190 s ξεκινά η έκλυση μιας δεύτερης κορυφής. Η κορυφή αυτή φτάνει σε ένταση 55.000 counts/s σε χρόνο 205 s και η έκλυσή της ολοκληρώνεται στα 230 s. Το χρωματογραφικό προφίλ αυτό που παρουσιάζει το πρότυπο διάλυμα του δισθενούς σιδήρου δημιούργησε προβληματισμούς σχετικά με τη μορφή του σιδήρου στο διάλυμα.

Μετά την ανάλυση και του πρότυπου διαλύματος τρισθενούς σιδήρου (**Εικόνα 32 Β**) παρατηρήθηκε πως η δεύτερη κορυφή που εκλούστηκε στο διάλυμα του δισθενούς σιδήρου αντιστοιχεί σε τρισθενή σίδηρο καθώς στην περίπτωση του δεύτερου παρατηρείται μία κορυφή η έκλυση της οποίας ξεκινά σε χρόνο 195 s και ολοκληρώνεται στα 250 s με μέγιστη ένταση 55.000 counts/s. Παράλληλα, στο χρόνο έκλυσης του δισθενούς σιδήρου γίνεται διακριτή μια αύξηση του σήματος που μπορεί να αποδεικνύει κάποια επιμόλυνση της στήλης από δισθενή σίδηρο.



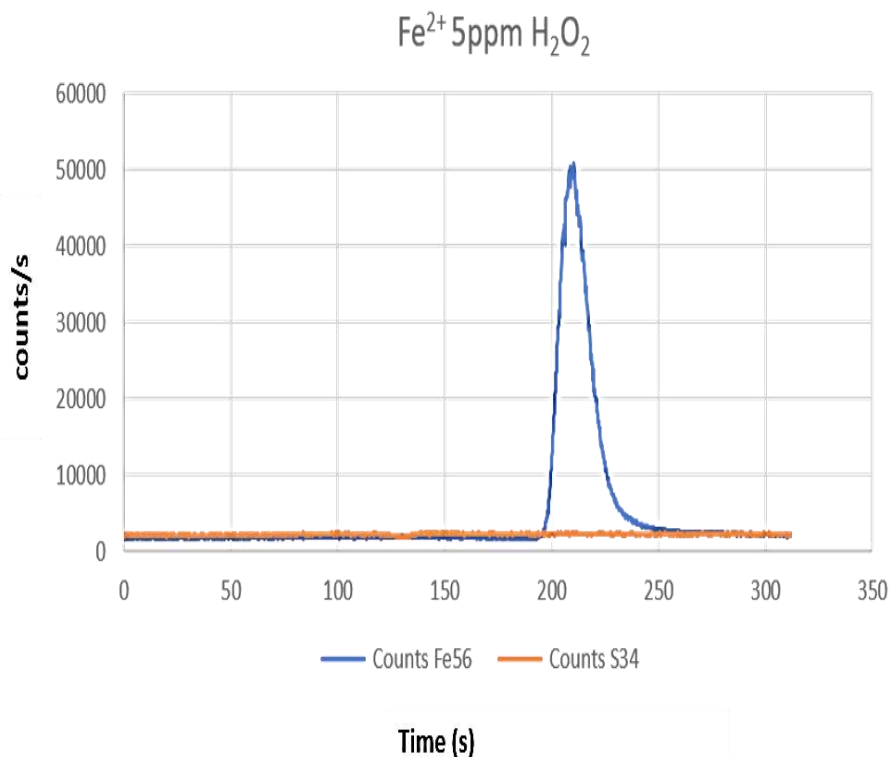
**Εικόνα 32.** Χρωματογραφήματα A)  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5 ppm και B)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 ppm.

Στην **Εικόνα 33** παρουσιάζεται η επικάλυψη των χρωματογραφημάτων των πρότυπων διαλυμάτων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου 5 ppm. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε το ερώτημα εάν πραγματοποιείται οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή αμέσως μετά τη δημιουργία του πρότυπου διαλύματος.



**Εικόνα 33.** Επικάλυψη χρωματογραφημάτων  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5 ppm και  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 ppm.

Προκειμένου να δοθεί μία απάντηση στο ερώτημα αυτό χρησιμοποιήθηκε το οξειδωτικό μέσο υπεροξείδιο του υδρογόνου για την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 34**, μετά την προσθήκη του οξειδωτικού μέσου παρατηρείται μία κορυφή, οι χρόνοι έκλουσης της οποίας αντιστοιχούν στους χρόνους έκλουσης του τρισθενούς σιδήρου στο αντίστοιχο πρότυπο διάλυμα. Συμπερασματικά, ο δισθενής σίδηρος στο πρότυπο διάλυμά του δεν διατηρείται και οξειδώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα στην τρισθενή μορφή.

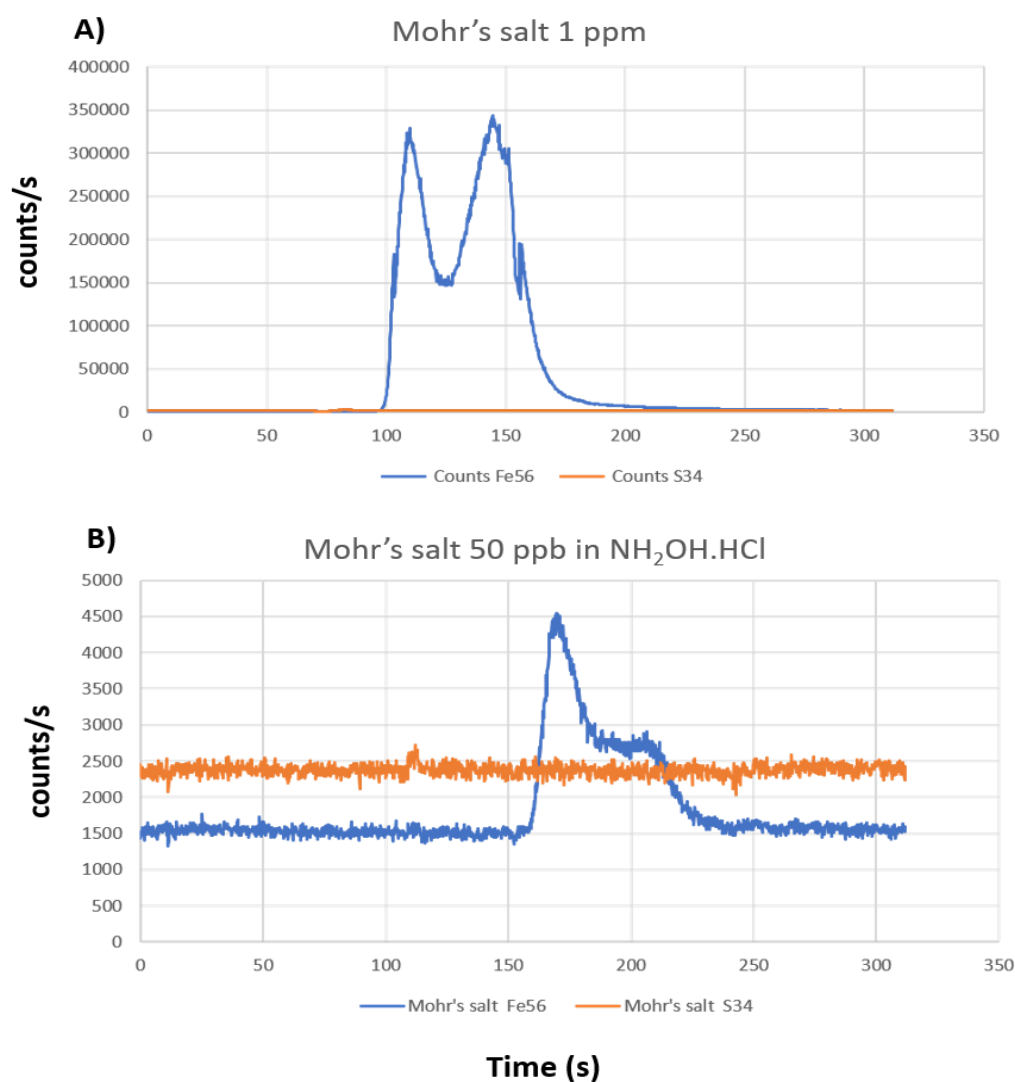


**Εικόνα 34. Χρωματογράφημα  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5 ppm μετά από προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Κρίθηκε συνεπώς αναγκαία η εύρεση πρότυπου διαλύματος δισθενή σιδήρου που να μην οξειδώνεται με την ίδια ευκολία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Mohr's salt  $\text{Fe}(\text{SO}_4)(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  σαν πηγή δισθενών ιόντων σιδήρου. Κατά τις πρώτες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα του θειικού σιδήρου αμμωνίου σαν πρότυπο διάλυμα δισθενούς σιδήρου μετά από διαλυτοποίηση του άλατος στην κινητή φάση 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA), 66mM KOH, 74mM HCOOH, 5,6mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Στο χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 1 ppm (Εικόνα 35 A) παρατηρείται η έκλυση δύο κορυφών. Η πρώτη κορυφή ξεκινά να εμφανίζεται στα 100 s και δεν ολοκληρώνεται η έκλυσή της καθώς ξεκινά να εμφανίζεται η δεύτερη κορυφή στα 125 s. Η έκλυση της δεύτερης κορυφής ολοκληρώνεται στα 200 s. Η ένταση των δύο εν λόγω κορυφών είναι παραπλήσιες, 32000 counts/s για την πρώτη και 35.000 counts/s για τη δεύτερη. Υπάρχει μία

μετατόπιση των κορυφών 50 s αργότερα σε σχέση με την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ωστόσο η ύπαρξη δύο κορυφών αποτελεί ένδειξη ύπαρξης και των δύο οξειδωτικών μορφών του σιδήρου στο πρότυπο διάλυμα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια διατήρησης του δισθενούς σιδήρου στην οξειδωτική αυτή βαθμίδα με την διαλυτοποίηση του άλατος, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>28</sup>, σε ένα αναγωγικό μέσο, το  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  0,1 M.



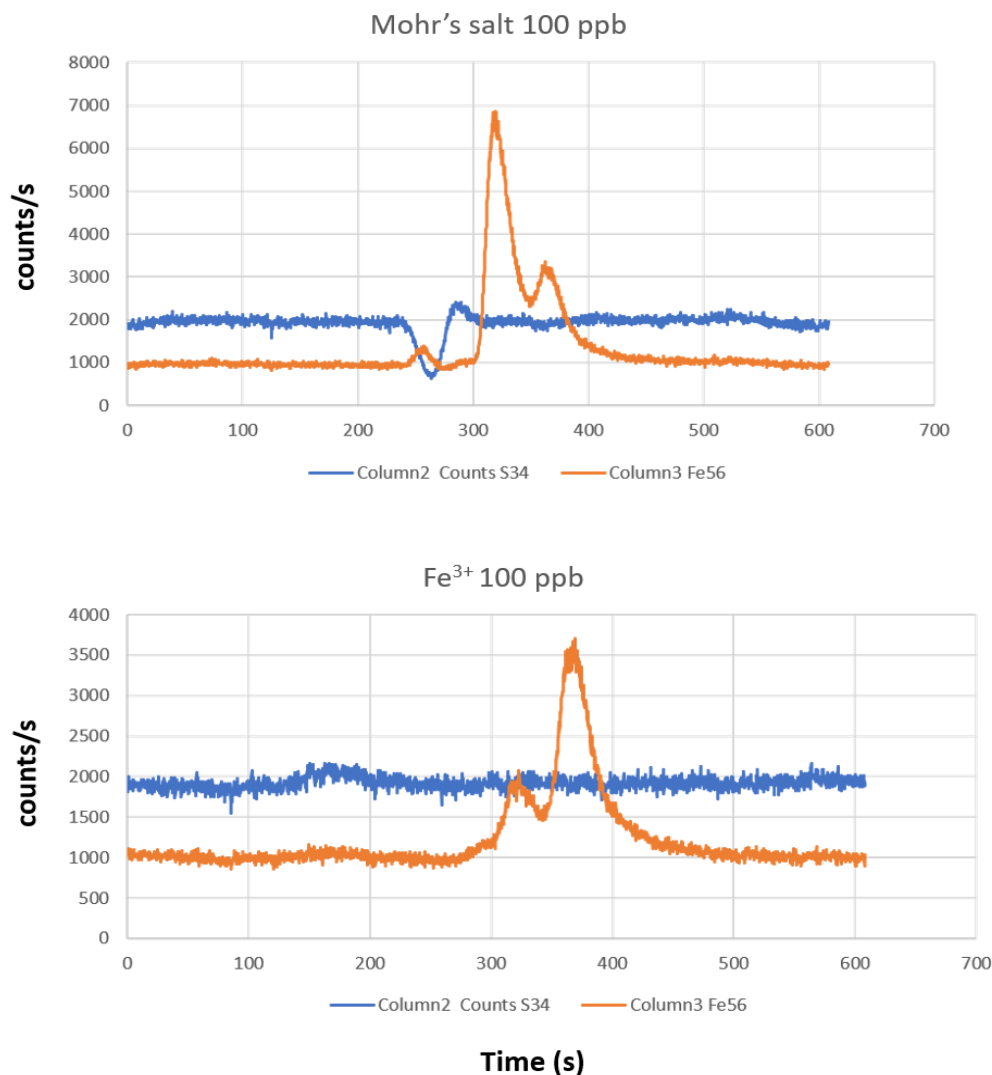
**Εικόνα 35.** Χρωματογραφήματα A) Mohr's salt 1 ppm σε 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA), 66mM KOH, 74mM HCOOH, 5,6mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και B) Mohr's salt 50 ppb σε  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ .

Στην περίπτωση αυτή, με την ανάλυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 50 ppb, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η ύπαρξη μίας κύριας κορυφής που ξεκινά να εκκλύεται στα 160 s με υψηλότερη ένταση τα 4.500 counts/s, η έκλυση της οποίας δεν ολοκληρώνεται και ξεκινά στα 200 s η έκλυση μιας δεύτερης πιθανώς κορυφής. Μετά από την πειραματική ανάλυση που παρουσιάστηκε η πίεση της στήλης εμφάνισε μεγάλη αύξηση πιθανώς λόγω υπερφόρτωσης της στήλης με σίδηρο από τα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, η στήλη ξεπλύθηκε με μεγάλο όγκο της κινητής φάσης για την απομάκρυνση επιμολύνσεων.

Για την επόμενη ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων μειώθηκε η ροή της κινητής φάσης από 0,3 mL/min σε 0,1 mL/min και η πίεση της στήλης σταθεροποιήθηκε στα φυσιολογικά πλαίσια ~ 1.070 psi. Ο χρόνος ανάλυσης αυξήθηκε από τα 5 στα 10 λεπτά. Μετά την αλλαγή αυτή παρατηρήθηκε και μείωση του υπόβαθρου από 1.500 counts/s σε 1.000 counts/s.

Στην **Εικόνα 36** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του δισθενούς σιδήρου Mohr's salt 100 ppb και τρισθενούς σιδήρου. Για το δισθενή σίδηρο (**Εικόνα 36 A**) παρατηρούνται εκ νέου δύο κορυφές ωστόσο η κορυφή που αντιστοιχεί πιθανώς στο δισθενή σίδηρο είναι μεγαλύτερης έντασης, 7.000 counts/s, σε σχέση με τη δεύτερη κορυφή που φτάνει τα 3.000 counts/s και ανήκει στον τρισθενή σίδηρο.

Από την ανάλυση του τρισθενούς σιδήρου (**Εικόνα 37 B**) προκύπτουν δύο κορυφές που εκκλύονται στον ίδιο χρόνο με εκείνες του δισθενούς σιδήρου. Η πρώτη κορυφή (δισθενής σίδηρος) εκκλύεται από τα 290 s και δεν ολοκληρώνεται πριν την έναρξη της έκλυσης της δεύτερης κορυφής (τρिसθενής σίδηρος) στα 350 s. Σε αυτήν την περίπτωση όπως είναι αναμενόμενο η ένταση της κορυφής που αντιστοιχεί στον τρισθενή σίδηρο είναι μεγαλύτερης έντασης, 3.500 counts/s σε σχέση με την κορυφή του δισθενούς σιδήρου, 2.000 counts/s.



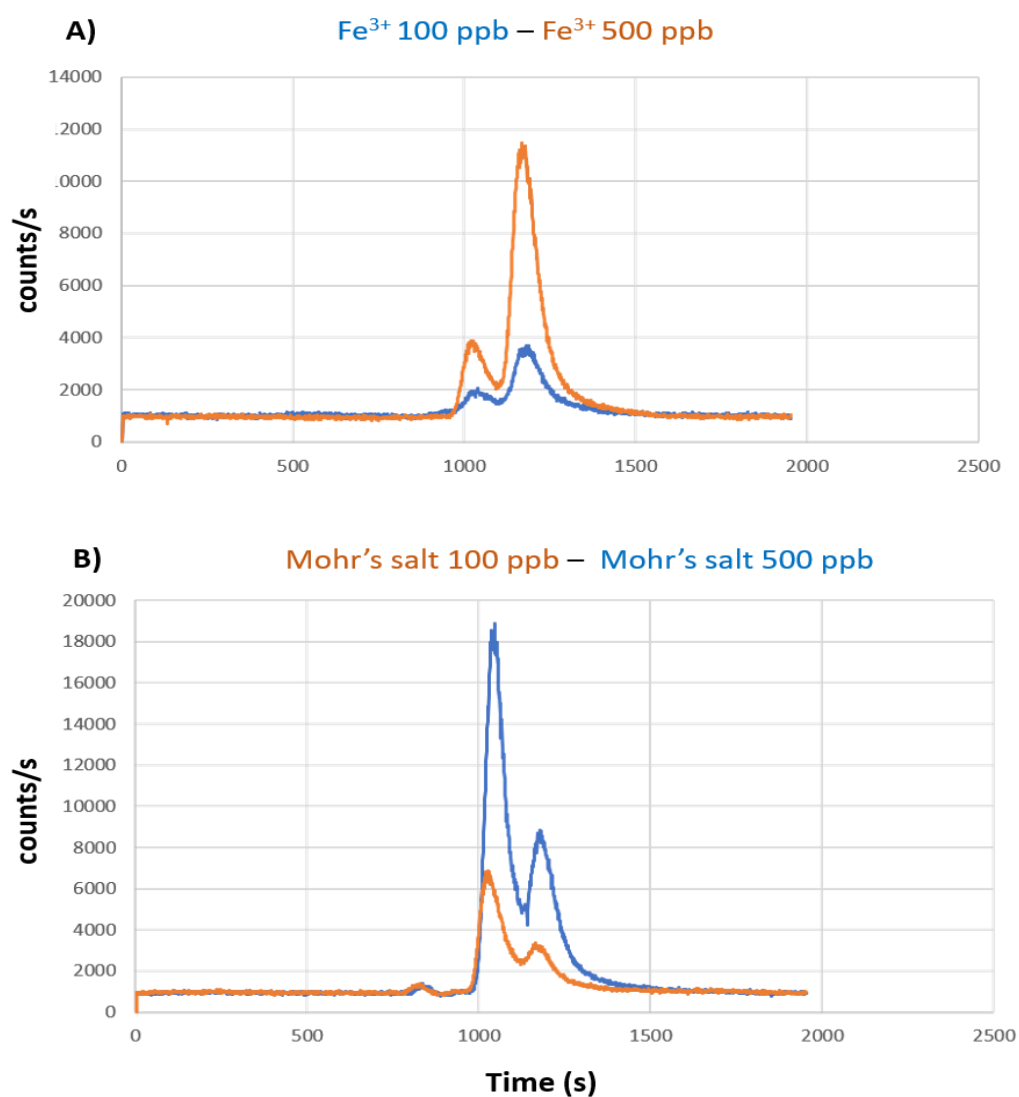
**Εικόνα 36. Χρωματογραφήματα Α) Mohr's salt 100 ppb σε  $NH_2OH.HCl$  και Β)  $FeCl_3.6H_2O$  100 ppb**

Όπως γίνεται αντιληπτό και από την παραπάνω ανάλυση, υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση της στήλης με τον δισθενή σίδηρο και για το λόγο αυτό εμφανίζεται και στο πρότυπο διάλυμα του τρισθενούς σιδήρου. Επιπλέον, παρά την προσθήκη του αναγωγικού αντιδραστηρίου, ο δισθενής σίδηρος μετατρέπεται σε τρισθενή. Για το λόγο αυτό στο πρότυπο διάλυμα του δισθενή σιδήρου η πρώτη κορυφή είναι μικρότερης έντασης καθώς ο δισθενής σίδηρος συνεχώς οξειδώνεται σε τρισθενή και όταν συμβαίνει αυτό μειώνεται η ένταση της πρώτης κορυφής και αυξάνεται αυτή της δεύτερης μέχρι να κορεστεί το πρότυπο διάλυμα με τρισθενή σίδηρο.



Προκειμένου να μελετηθεί και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου αλλά και η αλληλεπίδραση του με την στήλη πραγματοποιήθηκε έγχυση διαλυμάτων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου 500 ppb.

Στην **Εικόνα 37** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης που συμφωνούν πλήρως με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δύο μορφών σιδήρου σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων οδηγεί και σε αύξηση της έντασης των χρωματογραφικών κορυφών σε όλες τις περιπτώσεις.



**Εικόνα 37. Επικάλυψη χρωματογραφημάτων A)  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  100 ppb και 500 ppb και Mohr's salt 100 ppb και 500 ppb**

Τα πειραματικά αποτελέσματα που αναλύθηκαν παραπάνω και αφορούν στην εφαρμογή της μεθόδου HILIC-ICP-MS αποδεικνύουν τη δυνατότητα διαχωρισμού των δύο ανόργανων μορφών του σιδήρου όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό από τα χρωματογραφικά αποτελέσματα των αναλύσεων. Παρόλα αυτά παρουσιάζονται ορισμένοι περιορισμοί. Ο κυριότερος αφορά στην διατήρηση του δισθενή σιδήρου μετά την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα πιο ισχυρό αναγωγικό μέσο όπως το ασκορβικό οξύ<sup>32</sup>. Ένας επιπλέον περιορισμός είναι και η ισχυρή αλληλεπίδραση του δισθενή σιδήρου με τη στήλη όπως φαίνεται και από τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων τρισθενή σιδήρου όπου εμφανίζεται συστηματικά χρωματογραφική κορυφή που αντιστοιχεί στο δισθενή σίδηρο. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτό θα πρέπει να τροποποιηθεί καταλλήλως η κινητή φάση. Μια πιθανότητα θα ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος της κινητής φάσης που να μειώνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των ιόντων του δισθενή σιδήρου με τη στήλη.

### 3.6 Φασματομετρία μάζας

#### 3.6.1 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο συναρμογής του σιδήρου στο μόριο 2,6 pyridinedicarboxylic acid

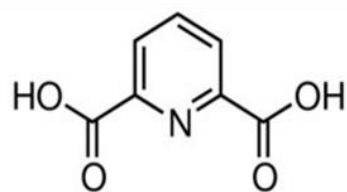
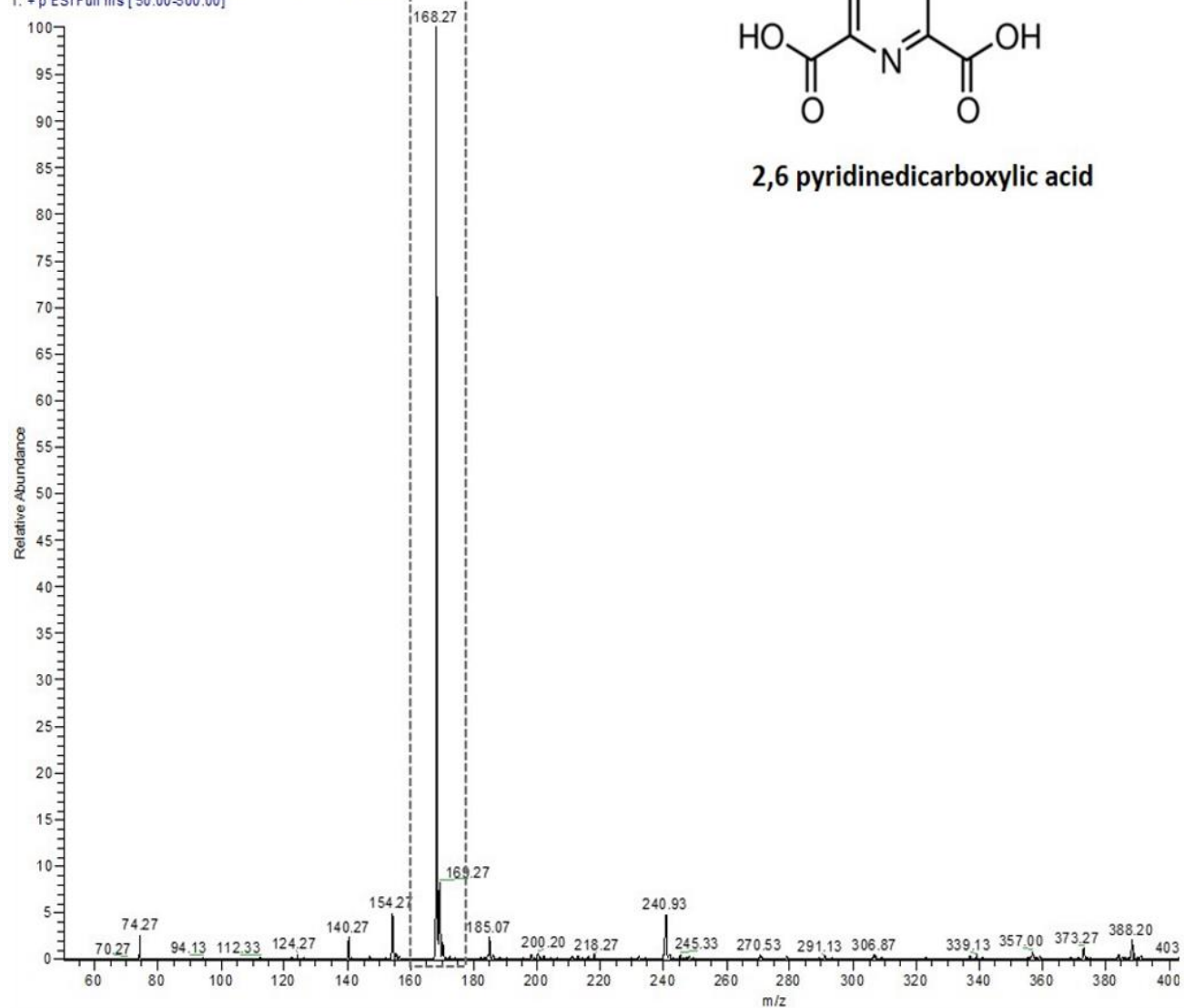
Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε το ερώτημα εάν το αντιδραστήριο PDCA που χρησιμοποιήθηκε μπορούσε στην πραγματικότητα να δεσμεύσει σίδηρο και αν ναι σε ποια μορφή. Επιπλέον, κρίθηκε απαραίτητη η εξέταση της καθαρότητας του αντιδραστηρίου, κατά πόσο είχε ήδη συναρμοσμένο σίδηρο πριν τη διαλυτοποίησή του.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού σε πρότυπα διαλύματα PDCA καθώς και σε διαλύματα με προσθήκη τρισθενούς ή δισθενούς σιδήρου,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  αντίστοιχα.

##### 3.6.1.1 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο του μορίου 2,6 pyridinedicarboxylic acid

Το 2,6 pyridinedicarboxylic acid έχει μοριακό βάρος 167,1189. Στο φάσμα της ένωσης (Εικόνα 38), που αντιστοιχεί στα θετικά ιόντα, εμφανίζεται το μοριακό ιόν 168,27 σαν το κύριο ιόν. Επομένως δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ύπαρξης συναρμοσμένου σιδήρου στο μόριο.

PDCA10mM#174-211 RT: 3.95-4.87 AV: 38 NL: 2.47E5  
T: +p ESI Full ms [50.00-500.00]



**2,6 pyridinedicarboxylic acid**

**Εικόνα 38. Φάσμα 2,6 pyridinedicarboxylic acid**

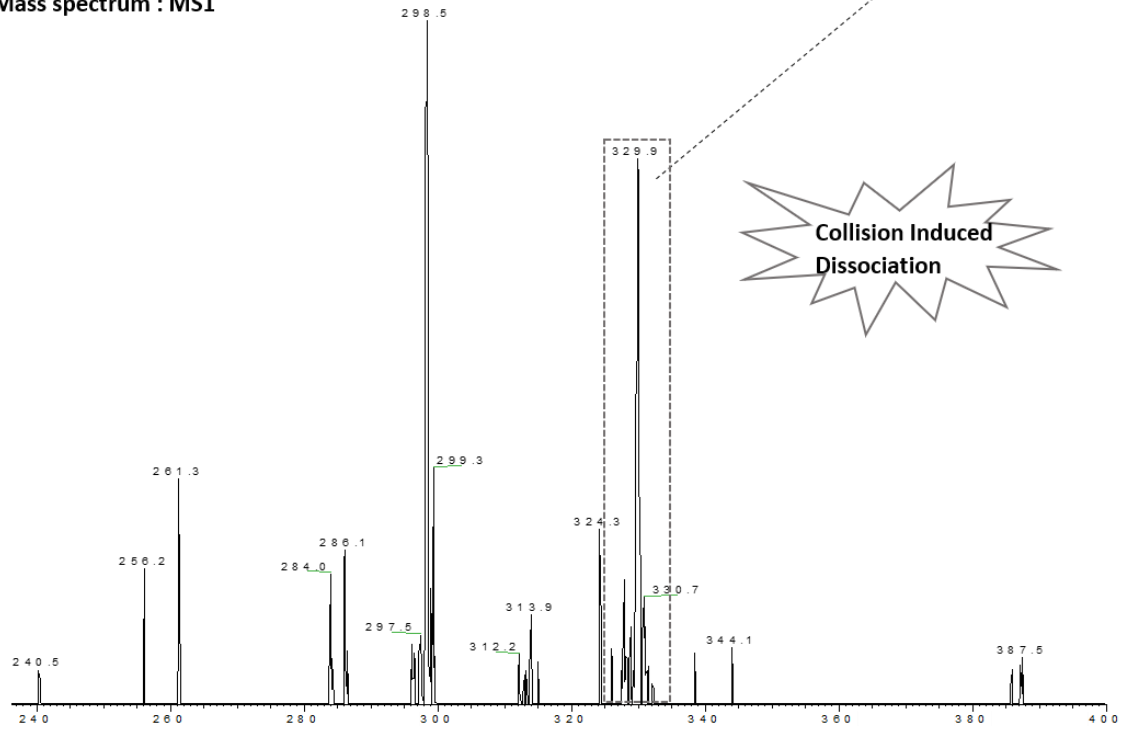
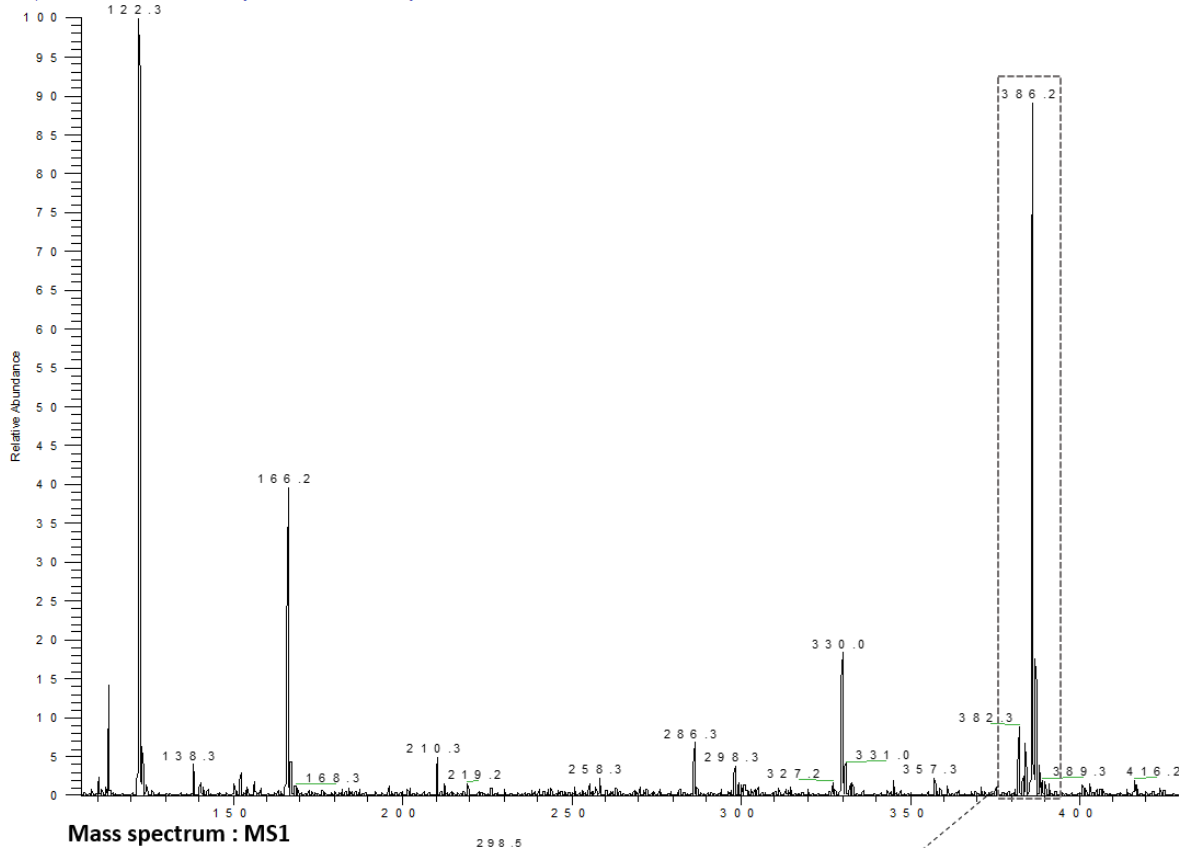
### 3.6.1.2 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο συναρμογής τρισθενούς σιδήρου στο μόριο 2,6 pyridinedicarboxylic acid

Σε αντίθεση με την ανάλυση του φάσματος του αντιδραστηρίου PDCA χωρίς προσθήκη εξωγενούς σιδήρου, η ανάλυση του φάσματος του αντιδραστηρίου με προσθήκη ποσότητας διαλύματος τρισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) καθιστά εμφανές πως ένα μόριο σιδήρου προσδέεται σε δύο μόρια του αντιδραστηρίου (**Εικόνα 39**). Το μοριακό ιόν αποτελεί το 386,2, στα αρνητικά ιόντα, η θραυσματοποίηση του οποίου δίνει ένα μοριακό ιόν 329,9 που πιθανότατα οφείλεται σε απώλεια αντιστοιχεί στην απώλεια του σιδήρου από το μόριο. Από τη βιβλιογραφία έχει προταθεί η δημιουργία ενός αρνητικά φορτισμένου συμπλόκου μεταξύ ενός τρισθενούς σιδήρου με δύο μόρια του αντιδραστηρίου PDCA. Πιο συγκεκριμένα, ο σίδηρος δημιουργεί δεσμούς με 4 οξυγόνα και 2 άζωτα από τα δύο μόρια του PDCA<sup>69</sup>. Η θραυσματοποίηση του κύριου ιόντος επιτυγχάνεται με τη μέθοδο CID (Collision Induced Dissociation). Το επιλεγμένο ιόν επιταχύνεται με την εφαρμογή δυναμικού που οδηγεί σε αύξηση της κινητικής του ενέργειας. Η αύξηση αυτή επιτρέπει τη σύγκρουση με ουδέτερα μόρια αδρανούς αερίου. Κατά αυτόν τον τρόπο ένα κομμάτι της κινητικής ενέργειας του επιλεγμένου ιόντος μετατρέπεται σε εσωτερική ενέργεια, με αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών και τη θραυσματοποίηση του ιόντος σε μικρότερα ιόντα<sup>70</sup>.

Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και το ιόν 166,2 που αντιστοιχεί σε ελεύθερο μόριο PDCA. Επιβεβαιώθηκε με αυτό τον τρόπο η πρόσδεση του τρισθενούς σιδήρου στο PDCA.

# 2,6-pyridinedicarboxylic acid – Fe<sup>3+</sup>

PDCAF350PPM #34-51 RT: 0.63-0.93 AV: 18 NL: 2.89E 4  
T: - p E S I s i d = 5 . 0 0 m s [ 1 0 5 . 0 0 - 8 0 0 . 0 0 ]



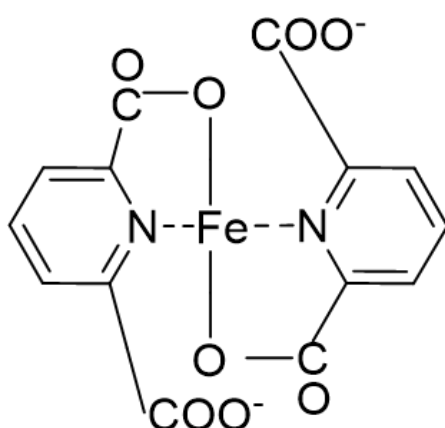
Εικόνα 39. Φάσμα 2,6 pyridinedicarboxylic acid-Fe<sup>3+</sup>

### 3.6.1.3 Φασματομετρία μάζας για τον έλεγχο συναρμογής δισθενούς σιδήρου στο μόριο 2,6 pyridinedicarboxylic acid

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, διεξάχθηκε ανάλυση μείγματος διαλυμάτων του αντιδραστήριου PDCA και δισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). προκειμένου να μελετηθεί η εκλεκτικότητα του PDCA.

Από το φάσμα που προκύπτει στα αρνητικά ιόντα, το μοριακό ιόν αντιστοιχεί στο 386,3. Από τη μελέτη του φάσματος του αντιδραστήριου με τρισθενή σίδηρο, είναι γνωστό πως το ιόν αυτό αντιστοιχεί σε δύο μόρια PDCA στα οποία βρίσκεται συνδεδεμένο ένα μόριο σιδήρου. Επομένως, και στην περίπτωση του δισθενούς σιδήρου δημιουργείται σύμπλοκη ένωση με το 2,6 pyridinedicarboxylic acid.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση το σύμπλοκο που δημιουργείται παρουσιάζεται στην **Εικόνα 40**.



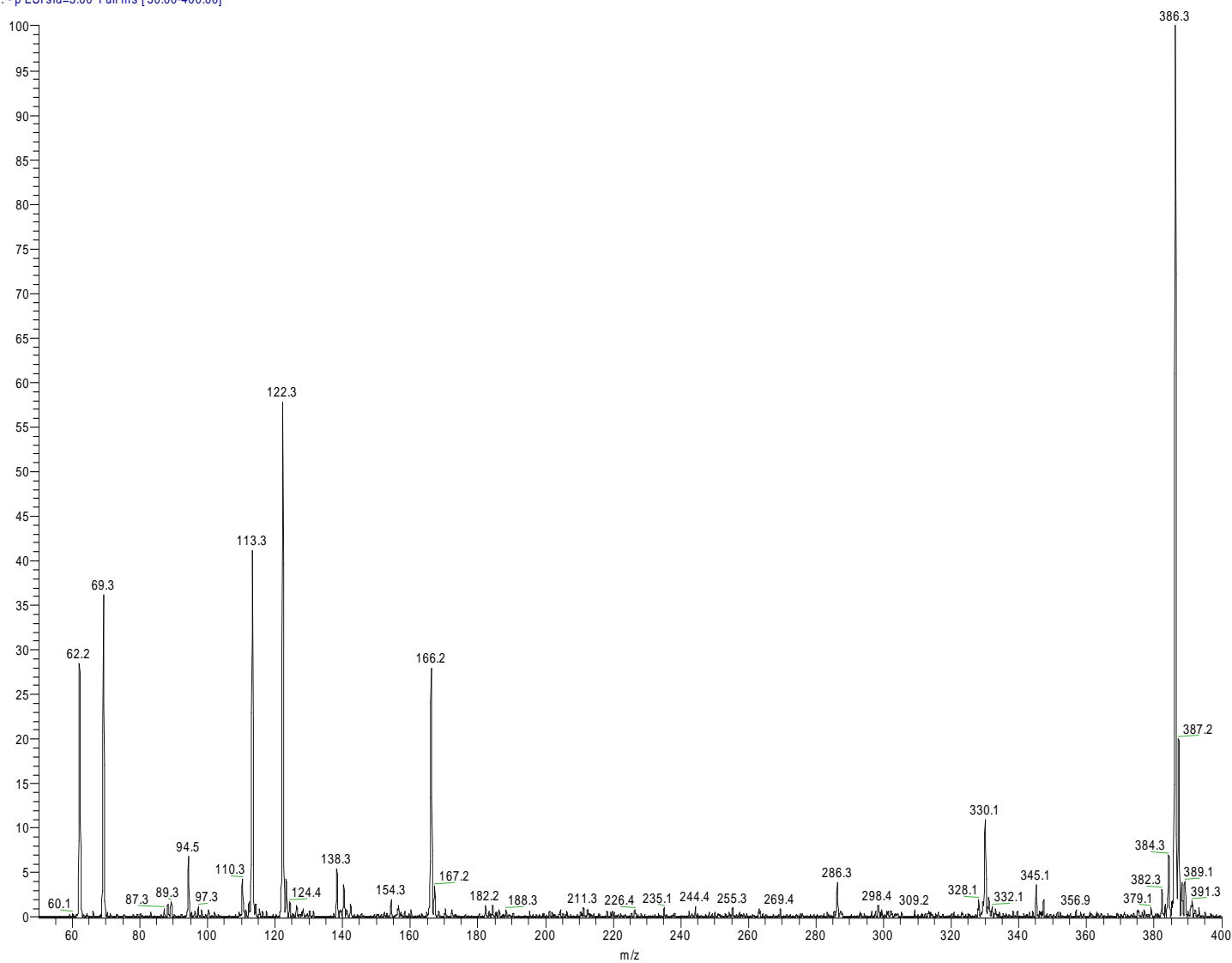
**Εικόνα 40.** Σύμπλοκη ένωση 2 μορίων 2,6 pyridinedicarboxylic acid με ένα άτομο Fe (II).

Ένα μόριο σιδήρου δημιουργεί δεσμούς με 2 άζωτα και 2 οξυγόνα από δύο μόρια PDCA. Το σύμπλοκο που προκύπτει φέρει φορτίο 2-.

Στο φάσμα φαίνεται και το ιόν του ελεύθερου PDCA που αντιστοιχεί στο 166.2 όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

# 2,6-pyridinedicarboxylic acid – Fe<sup>2+</sup>

PDCAFe250PPM\_01 #5-19 RT: 0.07-0.28 AV: 15 NL: 4.55E4  
T: -p ESI sid=5.00 Full ms [50.00-400.00]



Εικόνα 41. Φάσμα 2,6 pyridine dicarboxylic acid-Fe<sup>2+</sup>



#### 4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων διαχωρισμού των διαφορετικών ειδών σιδήρου τόσο σε βιολογικά δείγματα, μακροφάγα κύτταρα πειραματικών ποντικών, όσο και σε πρότυπα διαλύματα δισθενούς, τρισθενούς σιδήρου αλλά και τρανσφερίνης.

Ο σίδηρος είναι το δεύτερο σε αφθονία μέταλλο στη γη. Με δυνατότητα εύρεσής του σε δύο οξειδωτικές βαθμίδες ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού<sup>72</sup>. Πιο συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο σώμα είναι απαραίτητος ως συμπράγοντας σε πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά του οξυγόνου στον οργανισμό, για τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και για τη σύνθεση του DNA και τη γονιδιακή ρύθμιση<sup>73</sup>.

Εκτός από τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι αποδεδειγμένο πως ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη καθώς και τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων<sup>74</sup>. Επιπλέον, έχει συσχετιστεί με τη μολυσματικότητα των περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών καθώς η ρύθμιση των υπεύθυνων για την πρόσληψη του σιδήρου γονιδίων συνδέεται με το βαθμό μολυσματικότητας που παρουσιάζει το εκάστοτε παθογόνο.

Όπως αποδεικνύεται παραπάνω, ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την παθογένεση της Μουκορμύκωσης από το μύκητα *Rhizopus delemar*. Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του δεδομένου μύκητα. Σε αντίθετη περίπτωση, υπερφόρτωσης των κυττάρων με πηγή σιδήρου η ικανότητα αυτή χάνεται με αποτέλεσμα ο μύκητας να διαφεύγει καταστρέφοντας τα εν λόγω κύτταρα.

Στη μελέτη αυτή, καθιερώθηκε η χρήση του αντιδραστηρίου iron dextran για την υπερφόρτωση μακροφάγων κυττάρων με σίδηρο και μόλυνσή τους με το μύκητα *Rhizopus delemar*, που οδηγεί σε αδυναμία των κυττάρων να αναστείλουν την ανάπτυξη του μύκητα. Το μοντέλο αυτό εφαρμόστηκε και σε μακροφάγα κύτταρα μυελού των οστών αλλά και σε κυψελιδικά μακροφάγα από πνεύμονες πειραματικών ποντικών.

Προηγούμενες έρευνες<sup>18</sup> υποδεικνύουν την πιθανότητα η STEAP4 αναγωγή να έχει πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση του αποτελέσματος της μόλυνσης από το δεδομένο μύκητα. Ο ρόλος της STEAP4 αναγωγής έχει μελετηθεί εκτενώς ως ρυθμιστής της φλεγμονώδους απόκρισης<sup>75</sup> καθώς και ως ρυθμιστής του μεταβολισμού των κυττάρων<sup>75,76</sup>. Ωστόσο, ο ρόλος της στις λοιμώξεις παραμένει άγνωστος. Από τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν γίνεται φανερό πως η αναγωγή STEAP4 μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της μόλυνσης. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα που διεξήχθησαν σε διαγονιδιακά πειραματικά ποντίκια με έλλειψη της αναγωγής αυτής έδειξαν ανοχή στη λοίμωξη από το μύκητα *Rhizopus delemar*. Η ανοχή αυτή θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω με in vivo πειράματα μόλυνσης ποντικών για να εξεταστεί η πιθανότητα ενεργοποίησης κάποιου μηχανισμού που να οδηγεί στη θανάτωση των κονιδίων του μύκητα ενδοκυττάρια ή η δυνατότητα περιορισμού της ανάπτυξης του μύκητα ενδοκυττάρια. Επιπλέον, θα πρέπει να ελεγχθεί και ο ρόλος του σιδήρου αλλά και του χαλκού, καθώς η αναγωγή STEAP4 είναι εξίσου εκλεκτική και για τα δύο μέταλλα με μετρήσεις σε κύτταρα αλλά και φαγοσώματα του εν λόγω μύκητα.

Εν συνεχεία, θα πρέπει να δημιουργηθεί και ένα μοντέλο οξέωσης σε STEAP4-/- ποντικούς για να ερευνηθεί εάν η έλλειψη της STEAP4 αναγωγής μπορεί να επηρεάσει με τρόπο ευνοϊκό τη λοίμωξη. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε πως η οξέωση αποτελεί βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη Μουκορμύκωσης, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο μηχανισμός που οδηγεί σε αυτό. Η ήδη υπάρχουσα υπόθεση είναι πως λόγω της μείωσης του pH η τρανσφερίνη πρωτονιώνεται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση σιδήρου για εκμετάλλευση από το μύκητα. Στο μοντέλο οξέωσης σε STEAP4-/- ποντικούς θα είναι αδύνατη η είσοδος του απελευθερωμένου σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων, γεγονός που θα μπορούσε να περιορίσει τη λοίμωξη.

Η απάντηση στα παραπάνω βιολογικά ερωτήματα θα μπορούσε να δοθεί από την ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών για την ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση της μορφής του σιδήρου στα δείγματα αυτά. Στη μελέτη που παρουσιάστηκε έγινε

προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου ειδοταυτοποίησης του σιδήρου με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.

Στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία έχουν γίνει προσπάθειες κυρίως διαχωρισμού των διαφορετικών ειδών του σιδήρου σε ατμοσφαιρικά δείγματα αλλά οι αναφορές σε βιολογικά δείγματα είναι ελάχιστες. Οι περισσότερες από αυτές εστιάζονται σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό<sup>26,30,42,43,77</sup> ασθενών και οι τεχνικές που εφαρμόζονται συνδυάζουν ηλεκτροφόρηση, υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, κατιοντική χρωματογραφία και χρήση του ICP-MS.

Το εγχείρημα αυτό παρουσιάζει αρκετές προκλήσεις που οφείλονται τόσο στη φύση των δειγμάτων όσο και στην πολυπλοκότητα της ανάλυσης του συγκεκριμένου μετάλλου. Η διατήρηση των βιολογικών δειγμάτων αλλά και των πρότυπων δειγμάτων είναι ύψιστης σημασίας προκειμένου να μην υπάρξει διατάραξη της δέσμευσης του σιδήρου στις πρωτεΐνες-μόρια που βρίσκεται<sup>78</sup>. Επιπλέον, η οξειδοαναγωγική μετατροπή που υφίσταται ο σίδηρος πραγματοποιείται πολύ εύκολα στις κατάλληλες συνθήκες. Η οξείδωση του δισθενή σιδήρου γίνεται με την επαφή του με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Μία άλλη πρόκληση που παρουσιάζεται είναι η αποφυγή της επιμόλυνσης των δειγμάτων από εξωτερικές πηγές σιδήρου, καθώς σωματίδια σιδήρου μπορούν να βρεθούν σε μεταλλικά εξαρτήματα που υπάρχουν σε αντλίες υγρής χρωματογραφίας ακόμα και σε πλαστικά αναλώσιμα.

Για τον παραπάνω λόγο χρησιμοποιήθηκε αντλία χωρίς μεταλλικά μέρη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περνούσαν από διαδικασία φιλτραρίσματος με φίλτρο 0,4 μm για την απομάκρυνση σωματιδίων. Στο πρώτο κομμάτι της μεθόδου που αναπτύχθηκε με τη σύζευξη στήλης μοριακού αποκλεισμού με το φασματοόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με τη χρήση αντλίας υγρής χρωματογραφίας τα αποτελέσματα υποδεικνύουν το διαχωρισμό του δεσμευμένου στην τρανσφερίνη σιδήρου από τον ανόργανο σίδηρο χωρίς όμως να μπορεί να γίνει επαρκής διαχωρισμός των ανόργανων μορφών του σιδήρου. Δεν υπήρξε κατακράτηση του τρισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  Mr: 270.29) στη στήλη, αντιθέτως

η έκλουσή του συμπίπτει με την έκλυση του δεσμευμένου στην τρανσφερίνη σιδήρου.

Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε η αντλία από την πειραματική οργανολογία και η στήλη μοριακού αποκλεισμού συνδέθηκε απευθείας στο ICP-MS. Το διάλυμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν το  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1,5M pH~7 αλλά το διάλυμα 14 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA), 66 mM KOH, 74 mM HCOOH, 5,6 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$  pH ~ 4,22 για την καλύτερη έκλυση του ελεύθερου σιδήρου λόγω της δυνατότητας του αντιδραστηρίου PDCA να προσδένει τρισθενή και δισθενή σίδηρο. Στην προσπάθεια αυτή έγινε αντιληπτό πως είναι δυνατός ο διαχωρισμός πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους όπως η τρανσφερίνη (80 kDa) από μόρια σιδήρου μικρότερου μοριακού βάρους όπως η δεφεροξαμίνη (656,8). Επιπλέον, έγινε διαχωρισμός του δεσμευμένου στην τρανσφερίνη σιδήρου και μερικός διαχωρισμός των ανόργανων μορφών του σιδήρου. Ο διαχωρισμός αυτός όμως δεν είναι αρκετός για την ταυτοποίηση των κορυφών που αντιστοιχούν στον ανόργανο σίδηρο και ο επιπλέον προβληματισμός που δημιουργήθηκε ήταν η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των δειγμάτων με το PDCA με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του σιδήρου από αυτές. Κρίνεται απαραίτητο για την πειραματική αυτή πορεία η τροποποίηση του διαλύματος της κινητής φάσης με χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου PDCA.

Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να προστεθεί στην πειραματική διάταξη μια στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με περιοχή κλασματώσεως μικρότερη προκειμένου στην εφαρμογή της μεθόδου σε βιολογικά δείγματα να πραγματοποιείται πιο ευρύς διαχωρισμός.

Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας, ο σκοπός ήταν ο διαχωρισμός του ανόργανου σιδήρου στα διαφορετικά είδη του με την ανάπτυξη της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων. Με τα πειράματα που διεξήχθησαν αποδείχθηκε η έντονη οξειδοαναγωγική ικανότητα του σιδήρου, καθώς στο πρότυπο διάλυμα δισθενούς σιδήρου ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), ο σίδηρος οξειδωνόταν στην τρισθενή μορφή του. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο διάλυμα το Mohr's salt

που αντιστέκεται στην οξείδωση από τον αέρα. Παρόλα αυτά, και στην περίπτωση αυτή η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου ήταν άμεση. Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη ενός αναγωγικού μέσου ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ) για τη διατήρηση του πρότυπου διαλύματος. Μετά την παρασκευή του διαλύματος είναι απαραίτητη η ανάλυσή του καθώς παρατηρήθηκε η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου και σε αυτήν την περίπτωση.

Μεγάλης σημασίας είναι η εύρεση ενός αναγωγικού αντιδραστηρίου για τη διατήρηση του δισθενή σιδήρου καθώς φαίνεται πως με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων θα είναι εφικτός ο διαχωρισμός των ανόργανων μορφών του σιδήρου που δε μπορεί να επιτευχθεί με τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Οι μελλοντικές προσπάθειες θα εστιαστούν με βάση τα παραπάνω στη βελτιστοποίηση και των δύο μεθόδων διαχωρισμού προκειμένου να μπορεί να πραγματοποιηθεί και ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση των ειδών του σιδήρου τόσο σε πρότυπα διαλύματα όσο και σε βιολογικά δείγματα που δεν έχουν αναλυθεί προηγουμένως.

## Βιβλιογραφία

1. Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. Fungi that Infect Humans. *Microbiology Spectrum*. 2017;5(3). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016
2. Walsh TJ, Dixon DM. Spectrum of Mycoses. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
3. König A, Müller R, Mogavero S, Hube B. Fungal factors involved in host immune evasion, modulation and exploitation during infection. *Cellular Microbiology*. 2021;23(1). doi:10.1111/cmi.13272
4. Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I, et al. Aspergillus Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host and Microbe*. 2016;19(1):79-90. doi:10.1016/j.chom.2015.12.002
5. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. Aspergillus fumigatus and related species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5(2). doi:10.1101/cshperspect.a019786
6. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to Aspergillus species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(4):535-551. doi:10.1128/CMR.00014-09
7. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(3):447-465. doi:10.1128/CMR.00055-08
8. Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1994;32 Suppl 1:189-202. doi:10.1080/02681219480000821
9. Panackal AA, Bennett JE, Williamson PR. Treatment Options in Invasive Aspergillosis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*. 2014;6(3):309-325. doi:10.1007/s40506-014-0016-2
10. Mendoza L, Vilela R, Voelz K, Ibrahim AS, Voigt K, Lee SC. Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5(4). doi:10.1101/cshperspect.a019562
11. Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrikos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Medical Mycology*. 2018;56:S93-S101. doi:10.1093/mmy/myx101
12. Lewis RE, Kontoyiannis DP. Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future Microbiology*. 2013;8(9):1163-1175. doi:10.2217/fmb.13.78
13. Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(SUPPL. 1). doi:10.1093/cid/cir866

14. Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(SUPPL. 1). doi:10.1093/cid/cir865
15. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(1). doi:10.3390/ijms19010092
16. Ibrahim AS. Host cell invasion in mucormycosis: Role of iron. *Current Opinion in Microbiology*. 2011;14(4):406-411. doi:10.1016/j.mib.2011.07.004
17. Ibrahim AS, Spellberg B, Edwards J. Iron acquisition: A novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008;21(6):620-625. doi:10.1097/QCO.0b013e3283165fd1
18. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, et al. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nature Communications*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05820-2
19. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2014;19(2):164-174.
20. Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2019;1863(9):1398-1409. doi:10.1016/j.bbagen.2019.06.010
21. Heena, Malik AK. Review on metal speciation and their applications since 2010. In: *Chemical Analysis of Food*. Elsevier; 2020:813-868. doi:10.1016/b978-0-12-813266-1.00020-6
22. Hong YS, Kim YM, Lee KE. Methylmercury exposure and health effects. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2012;45(6):353-363. doi:10.3961/jpmp.2012.45.6.353
23. Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 2000;72(8):1453-1470. doi:10.1351/pac200072081453
24. Hare DJ, Grubman A, Ryan TM, et al. Profiling the iron, copper and zinc content in primary neuron and astrocyte cultures by rapid online quantitative size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Metallomics*. 2013;5(12):1656-1662. doi:10.1039/c3mt00227f
25. Bermejo P, Peña E, Domínguez R, Bermejo A, Fraga JM, Cocho JA. Speciation of iron in breast milk and infant formulas whey by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2000;50(6):1211-1222. doi:10.1016/s0039-9140(99)00233-7
26. Solovyev N, Vinceti M, Grill P, Mandrioli J, Michalke B. Redox speciation of iron, manganese, and copper in cerebrospinal fluid by strong cation exchange chromatography – sector field

- inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2017;973:25-33. doi:10.1016/j.aca.2017.03.040
27. Shumt SCK, Houk RS. Elemental Speciation by Anion Exchange and Size Exclusion Chromatography with Detection by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Direct Injection Nebulization. In: *Analytical Chemistry* 1993;11(65). doi: 10.1021/ac00069a006
  28. Hu Q. Simultaneous Separation and Quantification of Iron and Transition Species Using LC-ICP-MS. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2011;02(06):675-682. doi:10.4236/ajac.2011.26077
  29. Sario Muñiz C, Marchante Gayón JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A. Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2001;16(6):587-592. doi:10.1039/b100947h
  30. Michalke B, Willkommen D, Venkataramani V. Iron redox speciation analysis using capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS). *Frontiers in Chemistry*. 2019;7(MAR). doi:10.3389/fchem.2019.00136
  31. Gotti R, Fiori J, Liverani L, Spelta F. Capillary electrophoresis method for speciation of iron (II) and iron (III) in pharmaceuticals by dual precapillary complexation. *Electrophoresis*. 2015;36(21-22):2820-2827. doi:10.1002/elps.201500235
  32. Alchoubassi G, Aszyk J, Pisarek P, et al. Advances in mass spectrometry for iron speciation in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2017;104:77-86. doi:10.1016/j.trac.2017.11.006i
  33. Houk RS, Fassel VA, Flesch GD, Svec HJ, Gray AL, Taylor CE. Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*. 1980;52:2283-2289. doi:10.1021/AC50064A012
  34. Cubadda F. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. In: *Food Toxicant Analysis – Techniques, Strategies and Developments*. Elsevier; 2007:697-751. doi:10.1016/B978-044452843-8/50020-1
  35. Wilschefska SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*. 2019;40(3):115-133. doi:10.33176/AACB-19-00024
  36. Hall M. Size Exclusion Chromatography (SEC). In: *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier; 2018:421-432. doi:10.1016/B978-0-08-100623-8.00021-9
  37. Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-3707. doi:10.7150/thno.41580
  38. Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods. *Cytiva*.2020



39. Jensen PH, Mysling S, Højrup P, Jensen ON. Glycopeptide enrichment for MALDI-TOF mass spectrometry analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography solid phase extraction (HILIC SPE). *Methods in Molecular Biology*. 2013;951:131-144. doi:10.1007/978-1-62703-146-2\_10
40. Guo Y, Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(35):5920-5938. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.052
41. Greco G, Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(7):684-693. doi:10.1093/chromsci/bmt015
42. Michalke B, Berthele A, Venkataramani V. Simultaneous quantification and speciation of trace metals in paired serum and CSF samples by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma–dynamic reaction cell–mass spectrometry (SEC-DRC-ICP-MS). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16). doi:10.3390/ijms22168892
43. Nischwitz V, Berthele A, Michalke B. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Analytica Chimica Acta*. 2008;627(2):258-269. doi:10.1016/j.aca.2008.08.018
44. De La Flor St Remy RR, Sánchez MLF, Sastre JBL, Sanz-Medel A. Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2004;19(9):1104-1110. doi:10.1039/b401527d
45. Hare DJ, Grubman A, Ryan TM, et al. Profiling the iron, copper and zinc content in primary neuron and astrocyte cultures by rapid online quantitative size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Metallomics*. 2013;5(12):1656-1662. doi:10.1039/c3mt00227f
46. Yamada N. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2015;110:31-44. doi:10.1016/j.sab.2015.05.008
47. McCalley DV. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2017;1523:49-71. doi:10.1016/j.chroma.2017.06.026
48. D'Atri V, Fekete S, Beck A, Lauber M, Guillarme D. Hydrophilic Interaction Chromatography Hyphenated with Mass Spectrometry: A Powerful Analytical Tool for the Comparison of Originator and Biosimilar Therapeutic Monoclonal Antibodies at the Middle-up Level of Analysis. *Analytical Chemistry*. 2017;89(3):2086-2092. doi:10.1021/acs.analchem.6b04726

49. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;402(1):231-247. doi:10.1007/s00216-011-5308-5
50. Pramanik S, Chakraborty S, Sivan M, Patro BS, Chatterjee S, Goswami D. Cell Permeable Imidazole-Desferrioxamine Conjugates: Synthesis and in Vitro Evaluation. *Bioconjugate Chemistry*. 2019;30(3):841-852. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00924
51. Lane DJR, Merlot AM, Huang MLH, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2015;1853(5):1130-1144. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.021
52. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2016;37(2):51-62.
53. Geisser P, Burckhardt S. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of iron preparations. *Pharmaceutics*. 2011;3(1):12-33. doi:10.3390/pharmaceutics3010012
54. Scarl RT, Lawrence CM, Gordon HM, Nunemaker CS. STEAP4: Its emerging role in metabolism and homeostasis of cellular iron and copper. *Journal of Endocrinology*. 2017;234(3):R123-R134. doi:10.1530/JOE-16-0594
55. Gauss GH, Kleven MD, Sendamarai AK, Fleming MD, Lawrence CM. The crystal structure of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 4 (Steap4), a ferri/cuprioreductase, suggests a novel interdomain flavin-binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(28):20668-20682. doi:10.1074/jbc.M113.479154
56. Prakash H, Chakrabarti A. Global epidemiology of mucormycosis. *Journal of Fungi*. 2019;5(1). doi:10.3390/jof5010026
57. Prakash H, Chakrabarti A. Epidemiology of mucormycosis in India. *Microorganisms*. 2021;9(3):1-12. doi:10.3390/microorganisms9030523
58. Umpierrez GE, Kitabchi AE. Diabetic ketoacidosis: risk factors and management strategies. *Treatments in Endocrinology*. 2003;2(2):95-108. doi:10.2165/00024677-200302020-00003
59. Artis WM, Fountain JA, Delcher HK, Jones HE. A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. *Diabetes*. 1982;31(12):1109-1114. doi:10.2337/diacare.31.12.1109
60. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 2015;70(1):5.47.1-5.47.20. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70
61. Fernsebner K, Zorn J, Kanawati B, Walker A, Michalke B. Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe(ii)/(iii) in rat brain tissue. *Metallomics*. 2014;6(4):921-931. doi:10.1039/c4mt00022f

62. Trinta V de O, Padilha P de C, Petronilho S, et al. Total metal content and chemical speciation analysis of iron, copper, zinc and iodine in human breast milk using high-performance liquid chromatography separation and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Food Chemistry*. 2020;326. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126978
63. Kaplan J, Ward DM. The essential nature of iron usage and regulation. *Current Biology*. 2013;23(15). doi:10.1016/j.cub.2013.05.033
64. MacGillivray RT, Mendez E, Sinha SK, Sutton MR, Lineback-Zins J, Brew K. The complete amino acid sequence of human serum transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(8):2504-2508. doi:10.1073/pnas.79.8.2504
65. Balkhi S el, Poupon J, Trocello JM, Massicot F, Woimant F, Lapr evote O. Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection. *Analytical Chemistry*. 2010;82(16):6904-6910. doi:10.1021/ac101128x
66. Ding X, Mou S. Retention behavior of transition metals on a bifunctional ion-exchange column with oxalic acid as eluent. *Journal of Chromatography A*. 2001;920(1-2):101-107. doi:10.1016/s0021-9673(01)00550-7
67. Chen YC, Jian YL, Chiu KH, Yak HK. Simultaneous speciation of iron(II) and iron(III) by ion chromatography with chemiluminescence detection. *Analytical Sciences*. 2012;28(8):795-799. doi:10.2116/analsci.28.795
68. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography*. 1990;499:177-196. doi:10.1016/s0021-9673(00)96972-3
69. Ilkimen H, Yenikaya C, Sari M, B ulb ul M, Tunca E, Dal H. Synthesis and characterization of a proton transfer salt between 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-aminobenzothiazole, and its complexes and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2014;29(3):353-361. doi:10.3109/14756366.2013.782299
70. Mitchell Wells J, McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*. 2005;402:148-185. doi:10.1016/S0076-6879(05)02005-7
71. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012;51(29):5705-5724. doi:10.1021/bi300752r
72. Yiannikourides A, Latunde-Dada G. A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines*. 2019;6(3):85. doi:10.3390/medicines6030085
73. Symeonidis AS. The role of iron and iron chelators in zygomycosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009;15(SUPPL. 5):26-32. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02976.x
74. Wellen KE, Fucho R, Gregor MF, et al. Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell*. 2007;129(3):537-548. doi:10.1016/j.cell.2007.02.049

75. Ten Freyhaus H, Calay ES, Yalcin A, et al. Stamp2 controls macrophage inflammation through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate homeostasis and protects against atherosclerosis. *Cell Metabolism*. 2012;16(1):81-89. doi:10.1016/j.cmet.2012.05.009
76. Violi F, Solovyev N, Vinceti M, Mandrioli J, Lucio M, Michalke B. The study of levels from redox-active elements in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients carrying disease-related gene mutations shows potential copper dyshomeostasis. *Metallomics*. 2020;12(5):668-681. doi:10.1039/d0mt00051e
77. Das AK, Chakraborty R, Cervera ML, De La Guardia M. Metal Speciation in Biological Fluids-a Review. *Mikrochimica Acta*. 1996;122:209-246.