

# Iron metabolism, oxidative DNA damage and atherosclerosis

## Żelazo, wolne rodniki i oksydacyjne uszkodzenia DNA a choroba miażdżycowa

Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak

Department of Clinical Biochemistry, the L. Rydygier Medical University, Bydgoszcz, Poland (Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy)

---

### Abstract

*There are numerous data which pointed out that iron overload may promote development of atherosclerosis. Our recently obtained results suggest a mechanism that may directly link iron overload with atherosclerosis. Specifically, iron overload may favour the persistence of harmful labile (free) iron pool (LIP), which may catalyse generation of the potentially carcinogenic 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) moiety in the cellular DNA as well as may be responsible for LDL oxidation.*

**Key words:** iron, labile (free) iron pool, free radicals, lipid peroxidation, oxidative DNA damage, atherosclerosis

### Streszczenie

*Wolne żelazo (niezwiązane z białkami) może katalizować powstawanie w organizmie reaktywnych form tlenu (ROS), w tym wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać biocząsteczki, takie jak DNA, białka oraz lipidy. Obecnie w wielu pracach podkreśla się, że katalizowana przez żelazo peroksydacja lipidów (LDL) oraz uszkodzenia oksydacyjne DNA mogą być znaczącym czynnikiem w formowaniu zmian miażdżycowych. Zagadnieniu temu poświęcone jest poniższe opracowanie. Dotychczas nie poznano mechanizmu molekularnego, poprzez który żelazo może stymulować zmiany miażdżycowe. W tym kontekście niezwykle intrygującą wydaje się hipoteza, że miażdżycy może rozwijać się na tle zmian indukowanych uszkodzeniami DNA (8-oksydG) utrwalonymi w postaci mutacji. Zmiany te prowadziłyby do patologicznej proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych i w efekcie mogą przypominać rozwój guza łagodnego. Oksydacyjne uszkodzenia DNA (8-oksydG) obserwowano też w limfocytach u pacjentów chorych na miażdżycę, a należy pamiętać, że płytki miażdżycowe także zawierają limfocyty. W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszego artykułu po raz pierwszy na świecie wykazano, że pula wolnego żelaza jest około 2-krotnie wyższa w limfocytach u pacjentów z miażdżycą w porównaniu z grupą kontrolną. Zatem zrozumienie molekularnego podłoża zmian miażdżycowych i roli żelaza w tym procesie wydaje się obecnie jednym z kluczowych problemów biologii molekularnej i nauk klinicznych.*

**Słowa kluczowe:** żelazo, wolne żelazo, wolne rodniki, peroksydacja lipidów, oksydacyjne uszkodzenia DNA, miażdżycy

---

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr hab. med. Ryszard Oliński, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, AM im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85–092 Bydgoszcz, Poland  
tel.: +48 (0 52) 585 37 70, faks: +48 (0 52) 585 37 71, e-mail: ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl

## Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are the products of partial reduction of oxygen. These species which include superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical are continuously produced in living cells as by-products of normal metabolism [1–3]. During mitochondrial respiration 1–5 % of the oxygen undergo single electron transfer generating the superoxide anion ( $O_2^-$ ) radical in amounts corresponding to 2 kg per year for a human being. Reactive oxygen species have been postulated to play significant role in etiology of at least 50 diseases including rheumatoid arthritis, cancer, atherosclerosis, myocardial infarction, Parkinson's disease and AIDS. Reperfusion of ischemic tissues and chronic inflammation lead also to generation of ROS. Furthermore, UV and ionizing irradiation, wide variety of drugs and xenobiotics can stimulate the formation of ROS. A variety of carcinogens, including benzene, aflatoxin and benzopyrene may exert their effect partly through generation of ROS during their metabolism. The superoxide radical is degraded by superoxide dismutase (SOD) and hydrogen peroxide by catalase. However, reaction of hydrogen peroxide with transition metal ions, like iron, leads to highly reactive hydroxyl radical (OH). Interaction of this radical with cellular components may result in damage to biomolecules including DNA [4]. ROS can produce various kinds of DNA lesions, among them 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG). This oxidative DNA adduct is regarded as a good biomarker of cancer risk from oxidative stress, for investigations of effectiveness of dietary antioxidants and as a general index of oxidative stress in relation to other diseases such as cardiovascular diseases.

### Iron metabolism and oxidative DNA damage

Iron has the capacity to accept and donate electrons easily, changing between ferric ( $Fe^{2+}$ ) and ferrous ( $Fe^{3+}$ ) iron. Due to this feature it is useful component of cytochromes and oxygen binding molecules like hemoglobin and myoglobin (Table I) [5]. However, inside the cell iron can exist in another form, as a "free" or "labile" iron (LIP, iron not bound to proteins). LIP-associated iron is in dynamic equilibrium with other sequestered iron forms in the cell and is bound to cytosolic low molecular weight ligands that have not yet been identified. This iron form is catalytically active and participates in the reaction involved in the production of harmful ROS (the Haber-Weiss reaction) [1] (Fig. 1). Therefore, proteins sequester iron to reduce this threat. Iron ions circulate bound to plasma transferrin whereas ferritin serves to accumulate it [6–8]. In our study we analysed the broad spectrum of the components that affect iron metabolism as well as their possible association

## Wstęp

Obecnie wiadomo, że wolne żelazo (niezwiązane z białkami) może katalizować powstawanie niebezpiecznych dla organizmu reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*), a te natomiast mogą uszkadzać biocząsteczki, takie jak DNA, białka oraz lipidy. Uszkodzone makrocząsteczki, w wyniku działania ROS, mogą uczestniczyć w patogenezie wielu chorób, w tym w zmianach prowadzących do rozwoju miażdżycy [1–3]. Zagadnienie to wydaje się istotne, ponieważ w organizmie człowieka tylko podczas oddychania komórkowego 1–5% tlenu może uczestniczyć w tworzeniu anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ), i to w ilości odpowiadającej 2 kg rocznie. Ponadto wiadomo, że  $O_2^-$  jest metabolizowany z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, *superoxide olismutase*) do formy nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ). Nadtlenek wodoru w reakcji katalizowanej przez jony metali przejściowych, w tym jony żelaza ( $Fe^{+3}$ ,  $Fe^{+2}$ ), uczestniczy w tworzeniu wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (OH), który może reagować z każdą napotkaną cząsteczką, w tym z DNA i lipidami. Reaktywne formy tlenu mogą powodować różne uszkodzenia DNA, a charakterystycznym efektem ich oddziaływania z DNA jest powstanie 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) — promutagennej modyfikacji. Ta oksydacyjna modyfikacja DNA jest dobrym bio wskaźnikiem stresu oksydacyjnego i niektórych chorób człowieka, włącznie z chorobami układu sercowo-naczyniowego [4].

Obecnie sugeruje się, że katalizowana przez żelazo peroksydacja lipidów (wolnorodnikowy proces utleniania lipidów, w którym powstają nadtlenki lipidowe) oraz uszkodzenia oksydacyjne DNA mogą być znaczącym czynnikiem w formowaniu zmian miażdżycowych.

Zatem żelazo, które jak wiadomo jest niezbędnym czynnikiem funkcjonowania organizmu (patrz niżej), ma także to drugie, „groźne” oblicze — w warunkach podwyższonego występowania może stanowić istotne zagrożenie dla organizmu. Temu problemowi poświęcony jest niniejszy artykuł, ponieważ wciąż niejasne są mechanizmy, za pomocą których żelazo może stymulować zmiany miażdżycowe.

### Metabolizm żelaza a stres oksydacyjny

Żelazo jest metalem niezbędnym do funkcjonowania niemal wszystkich form życia. Szczególne znaczenie żelaza w układach biologicznych wiąże się z tym, że zmiany stanu utlenienia tego pierwiastka  $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$  dokonują się w szerokim zakresie potencjału oksydoredukcyjnego, który dodatkowo mogą modyfikować koordynujące żelazo ligandy. Właściwości redoks żelaza zdecydowały, że metal ten jest funkcjonalnym elementem wielu białek i enzymów biorących udział w kluczowych procesach biolo-

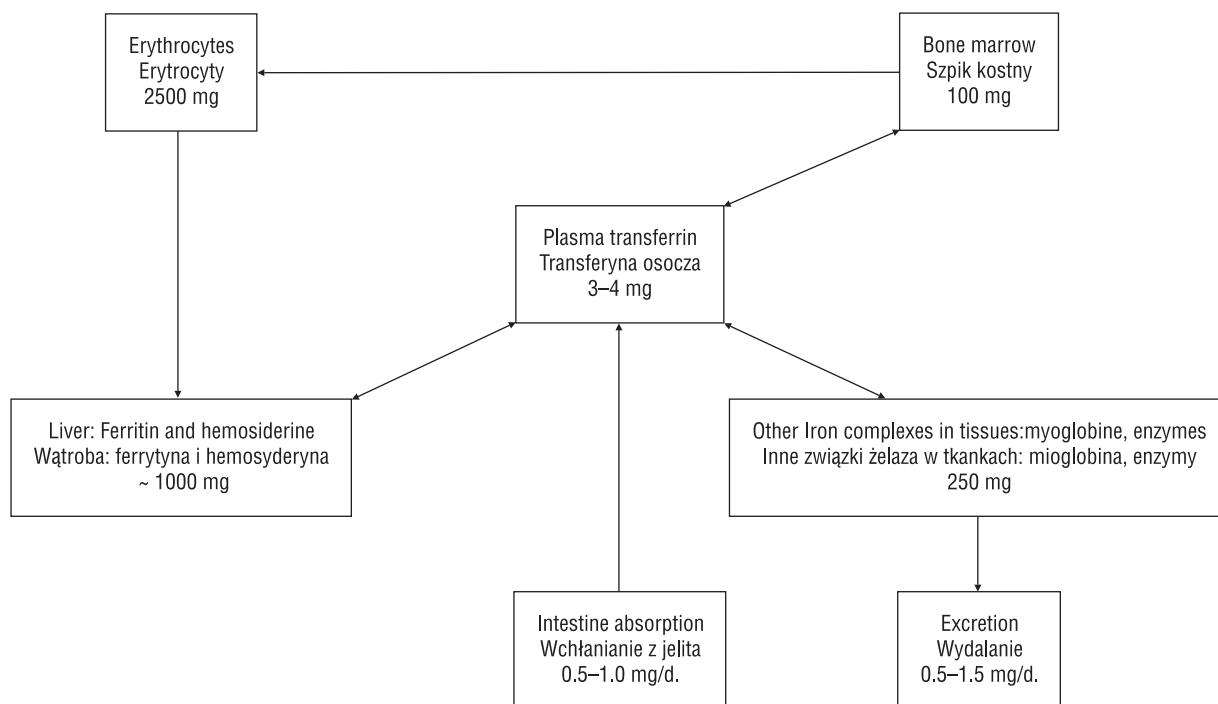
**Table I.** Iron storage in human body (adapted from several authors)**Tabela I.** Zawartość żelaza w organizmie człowieka (na podst. różnych autorów, zmienione)

Iron complexes Związki żelaza	Iron Żelazo [g]	Iron stores Całkowita zawartość żelaza (%)
Total Całkowita zawartość	3.5–4.5	100
Haemoglobin Hemoglobina	2.18–2.76	62.0–66.0
Ferritin and haemosiderin Ferrytyna i hemosyderyna	0.5–1.0	19.0–25.0
Myoglobin Mioglobina	0.15–0.18	4.5–5.0
Transferrin Transferyna	0.005–0.007	0.14–0.17
Cytochroms and other enzymes Cytochromy i inne enzymy	0.03	0.7
Other complexes Inne związki	~ 0.5	~ 0.005

with the endogenous level of 8-oxodG [9]. No correlation has been found between plasma concentration of ferritin or transferrin saturation and the amount of 8-oxodG in the DNA of lymphocytes. On the other hand a good correlation has been determined between LIP and the oxida-

gicznych, takich jak transport tlenu, synteza DNA, uzyskiwanie energii w komórce. Żelazo wchodzi w skład cytochromów, hemoglobiny i mioglobiny oraz niektórych enzymów (tab. I). Połączenia żelazo-siarka i żelazo-protoporfiryna (hem) są kofaktorami niektórych enzymów [5].

Właściwości, które czynią żelazo składnikiem niezbędnym dla organizmów żywych, decydują również o jego działaniu toksycznym. Toksyczność ta u organizmów aerobowych ściśle się wiąże z metabolizmem tlenu. Dlatego żywe organizmy są chronione przed oksydacyjnymi uszkodzeniami m.in. przez białka wiążące żelazo. Jony żelaza krążą w osoczu związane z transferyną i są akumulowane przez komórki w formie ferrytyny. W większości komórek ssaków homeostaza żelaza jest koordynowana przy udziale receptora dla transferyny (TfR), białka odpowiedzialnego za transport żelaza do komórki w formie kompleksu z transferyną (Tf) oraz ferrytyny (FR), białka, którego cząsteczka może przyłączyć do 4500 atomów żelaza, ograniczając toksyczność wolnego żelaza w komórce, jak również będącego źródłem jego zapasów [6]. Żelazo w komórce występuje głównie w postaci nieaktywnej formy związanej z FR. Ponieważ potrzebne jest także wolne żelazo niezbędne do syntezy wielu enzymów, dlatego w komórce występuje niewielka pula wolnego żelaza (*iron labile pool*), które może katalizować reakcję Habera-Weissa. Gromadzenie i absorpcja żelaza w organizmie są zatem precyzyjnie regulowane [1] (ryc. 1).

**Figure 1.** Iron metabolism in human body (adapted from several authors)**Rycina 1.** Metabolizm żelaza w organizmie człowieka (na podst. różnych autorów, zmienione)

tively modified nucleoside. This in turn suggests that under physiological conditions LIP is available for catalysing the Haber-Weiss type of reaction in a close proximity to cellular DNA. However, neither the exact chemical nature of the complex between iron and DNA is not known, nor it is established how iron can get into the nucleus.

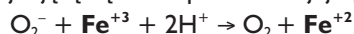
There are experimental data, which demonstrate the existence of free iron pool in sera of patients with hemochromatosis. This disease predisposes to cancer and cardiovascular diseases. Epidemiological data also suggest that elevation of the body iron level may increase risk of cancer and atherosclerosis [6, 10]. Our results suggest a mechanism that may directly link iron overload with carcinogenesis and atherosclerosis. Specifically, iron overload may favour the persistence of harmful LIP, which may catalyse generation of the potentially carcinogenic 8-oxodG moiety in the cellular DNA as well as may be responsible for LDL oxidation [9].

### Iron metabolism and atherosclerosis

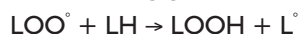
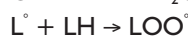
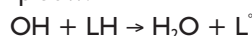
The possibility that iron overload may play an important role in cardiovascular diseases was put forward in 1981 by J.L. Sullivan [11]. Now there are increasing epidemiological evidences concerning the role of iron in atherosclerosis [12, 13]. In the study, which comprised 826 patients, it has been shown that serum ferritin was one of the strongest risk predictors of overall progression of atherosclerosis [12]. It has been also demonstrated a synergistic association between hyperlipidemia and serum ferritin [14]. Interestingly it has been recently found that heterozygosity for hereditary hemochromatosis (the disease with abnormal iron storage) is a risk factor for vascular diseases [15]. However, this finding is still controversial. There are also some evidences that iron depletion protects against atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD) [16]. In this context it is interesting to note that in premenopausal women the incidence of atherosclerosis and CVD is less than half that of age-matched men [1, 6]. One of the possible explanation of this finding may be that depletion of iron stores by regular menstrual blood loss may be one source of protection of premenopausal subjects.

Our data also suggest that iron metabolism may have some influence on atherosclerosis development. In agreement with previous study we have found that ferritin concentration was higher in atherosclerotic patients than in control group (although these changes were statistically insignificant) [9]. However, it must be noted that increases ferritin concentration generally reflects iron stores but may also be related to high alcohol consumption, cancer and inflammation [17]. Therefore, for the first time, we decided to analyse labile iron pool in

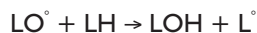
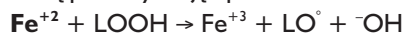
Jednak w obecności jonów wolnego żelaza, przy udziale stosunkowo mało reaktywnych biologicznie częściowo zredukowanych form tlenu, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, powstaje w reakcji Habera-Weissa rodnik hydroksylowy (OH), cząsteczka o niespotykanym w układach biologicznych potencjale utleniającym, reagująca z każdą biocząsteczką znajdującą się w bezpośrednim jej sąsiedztwie.



Powstający w tej reakcji rodnik OH może inicjować oderwanie atomu wodoru z cząsteczki wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LH), inicjując peroksydację lipidów.



Nadtlenki lipidowe (LOOH) są akumulowane i w obecności jonów wolnego żelaza mogą inicjować dodatkową peroksydację lipidów.



Takie reakcje mogą przebiegać kaskadowo, wywołując uszkodzenia biomolekuł komórkowych. Powstający w powyższych reakcjach rodnik OH jest bardzo reaktywny i chociaż okres jego półtrwania wynosi tylko  $10^{-9}$  s, może on uszkadzać wszystkie organiczne molekuly komórkowe, w tym DNA (generując 8-oksodG) [2–3]. Wyjaśnia to zagrożenia, które płyną ze strony wolnego żelaza, który może inicjować stres oksydacyjny, włączając się w patogenezę takich chorób, jak cukrzyca, miażdżyca czy też starzenie się organizmu. W stanie zdrowia komórki organizmu człowieka zawierają śladowe ilości wolnego żelaza, co potwierdzają badania przeprowadzone metodą fluorometryczną z zastosowaniem kalceiny. Stężenie to oszacowano pomiędzy 0,2–1,25  $\mu\text{mol}$  [7]. Może ono ulegać podwyższeniu podczas uwalniania żelaza w komórce lub obniżeniu w wyniku chelatacji.

Warto również zaznaczyć, że rodnik  $\text{O}_2^-$  przyczynia się do uwalniania żelaza z ferrytyny. Najprawdopodobniej  $\text{O}_2^-$  penetruje rdzeń ferrytyny przez hydrofilowy kanał, redukując żelazo do postaci  $\text{Fe}^{+2}$  [8].

Autorzy niniejszej publikacji analizowali szerokie spektrum czynników, które mogą wpływać na metabolizm żelaza oraz ich prawdopodobny wpływ na endogenne stężenie 8-oksodG [9]. Nie wykazano korelacji pomiędzy koncentracją w surowicy ferrytyny i transferyny a stężeniem 8-oksodG w DNA limfocytów. Wykazano jednak korelację pomiędzy stężeniem żelaza wolnego a stężeniem oksydacyjnie zmodyfikowanego nukleozydu. Może to wskazywać, że żelazo w warunkach

human lymphocytes. As it was mentioned above this iron form is catalytically active and participates in the reaction involved in the production of harmful ROS (the Haber-Weiss reaction). The mean value of labile iron pool in lymphocytes of control group was  $0.59 \mu\text{M}$ . Interestingly the LIP in lymphocytes of the patient group was about two times higher than that in control group. Our finding suggests that LIP fraction might have significant role in atherosclerosis, presumably due to formation of prooxidative conditions.

Oxidized LDL is recognized by scavenger receptors on tissue macrophages, followed by accumulation of lipids in these cells and the formation of foam cells, the characteristic cells of the fatty-streak lesions of early atherosclerosis [18–22].

### Oxidative DNA damage and atherosclerosis

Recent studies suggest that DNA alterations are present in cancerous and atherosclerotic tissues and can play a fundamental role in the pathogenesis of this disease [23–27]. Interestingly, DNA samples extracted from the cells of atherosclerotic lesions possess transforming capability [28]. These data support the view that at least part of atherogenic lesions may be initiated by mutational events in the same manner as a benign tumor [28]. Moreover, there are some experimental data, which strongly suggest that the elevated level of 8-oxodG found in the lesion of the aorta walls of atherosclerotic patients may be one of the events directly involved in the development of the disease [29]. In our recently published work it has been found that the level of 8-OH-dG in lymphocytes of 43 atherosclerotic patients was significantly higher than in DNA of the control group (12.78 and 9.80 lesions/ $10^6$  dG respectively). This changes may have some influence on the development of atherosclerosis in the following way. The plaques of the arterial walls, among others components, contains lymphocytes [9]. Since 8-oxoGua has mutagenic properties and is a block to transcription in mammalian cells [30], it is possible that lymphocytes with higher amount of this modified base trapped into the plaque, can more easily be involved in initiation — promoting process. There are suggestions that this process may be responsible for the formation of atherosclerotic lesion. Thereafter, the higher amount of trapped cells can lead to more advanced lesions.

As it was demonstrated oxidized LDL could play an important role in development of atherosclerotic lesions [18, 19]. Interestingly, it has been recently found that oxidize LDL (but not unmodified molecule) down regulates enzymes which take part in base excision repair (BER) pathway [31]. This DNA repair mechanism is re-

fizjologicznych katalizuje reakcję Habera-Weissa w sąsiedztwie komórkowego DNA. Jednak nadal nie jest jasna chemiczna natura kompleksów, jakie tworzy żelazo z DNA oraz mechanizm transportu żelaza do jądra komórkowego.

Istnieją dane pochodzące z badań eksperymentalnych, w których wykazano podwyższoną zawartość wolnego żelaza w surowicy chorych na hemochromatozę. Schorzenie to predysponuje do częstszego zapadania na nowotwory i choroby sercowo-naczyniowe. Badania epidemiologiczne również sugerują, że podwyższone stężenie żelaza w organizmie może zwiększać ryzyko zapadalności na nowotwory i miażdżycę [6, 10]. Wyniki badań autorów niniejszej pracy mogą wskazywać mechanizm, dzięki któremu podwyższone stężenie żelaza można łączyć z karcynogenezą i zmianami miażdżycowymi. Podwyższone całkowite stężenie żelaza w organizmie może sprzyjać występowaniu żelaza wolnego, które może katalizować (poprzez reakcje wolnorodnikowe) generowanie potencjalnie karcynogennej 8-oksydG w komórkowym DNA, jak również może katalizować utlenianie LDL [9].

### Żelazo w patogenezie miażdżycy

Hipotezę zakładającą, że podwyższone stężenie żelaza odgrywa ważną rolę w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego zaproponował w 1981 r. Sullivan [11]. Obecnie, wyniki coraz liczniejszych badań epidemiologicznych potwierdzają rolę żelaza w rozwoju miażdżycy [12, 13]. W badaniach obejmujących grupę 826 pacjentów wykazano, że wysokie stężenie w ferrytynie surowicy stanowi jeden z ważniejszych czynników ryzyka progresji zmian miażdżycowych [12]. Wykazano również synergistyczny związek między hiperlipidemią a ferrytyną w surowicy [14]. Interesujące, że heterozygotyczność w przypadku dziedzicznej hemochromatozy (choroba z nieprawidłowym gromadzeniem żelaza) jest czynnikiem ryzyka rozwoju chorób naczyniowych [15]. Jednak dane te są nadal kontrowersyjne. Ciekawe są wyniki badań wskazujące, że zmniejszenie puli żelaza ustrojowego chroni przed rozwojem zmian miażdżycowych i chorób sercowo-naczyniowych [16]. W tym kontekście interesujące jest, że u kobiet w okresie premenopauzalnym występowanie tych schorzeń jest o połowę rzadsze niż u mężczyzn w tym samym wieku [1, 6]. Jednym z czynników wyjaśniających tę sytuację może być regularny ubytek żelaza wraz z krwią menstruacyjną, co może być jednym z mechanizmów chroniących takie kobiety.

Również wyniki z przeprowadzonych badań własnych sugerują, że metabolizm żelaza może wiązać się z rozwojem zmian miażdżycowych. Zgodnie z wcześ-

sponsible for removal of 8-oxoG from cellular DNA. Therefore, it is possible that oxidized LDL, which contributes directly to the development of atherosclerosis due (via formation of foam cells), may be also one of the factors responsible for the high level of 8-oxodG observed by us in blood lymphocytes [9]. Moreover, it has been also shown vitamin C (together with A-tocopherol) prevented this down regulation.

In conclusion, there are numerous data which point out that iron overload may promote development of atherosclerosis. Our recently obtained data suggest that LIP fraction may fulfil a pivotal role in this process.

niejszymi doniesieniami wykazano wyższe stężenie ferrytyny w surowicy pacjentów ze zmianami miażdżycowymi w porównaniu z grupą kontrolną (statystycznie nieistotne) [9]. Jednak należy odnotować, że wzrost koncentracji ferrytyny, głównie odzwierciedla nasilone gromadzenie żelaza, ale również może wiązać się ze spożywaniem dużych ilości alkoholu, chorobą nowotworową czy też stanami zapalnymi [17]. W badaniach autorów niniejszego artykułu po raz pierwszy na świecie podjęto próbę analizy puli wolnego żelaza w limfocytach człowieka [9]. Ta forma żelaza katalizuje reakcje, w których powstają ROS (patrz wyżej). Zawartość wolnego żelaza w limfocytach u osób z grupy kontrolnej ustalono na  $0,59 \mu\text{M}$ . Interesujące, że w limfocytach u chorych z miażdżycą pula wolnego żelaza jest około 2-krotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Wyniki tych badań potwierdzają, że frakcja wolnego żelaza może być znaczącym czynnikiem w rozwoju zmian miażdżycowych przez udział w formowaniu stanu prooksydacyjnego.

Sugeruje się udział żelaza jako czynnika katalizującego wytwarzanie wolnych rodników i stymulującego peroksydację lipidów (patrz wyżej), która jest znaczącym czynnikiem w procesie formowania płytek miażdżycowych.

Sugestie te potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych ostatnio, które coraz wyraźniej wskazują na udział ROS w patogenezie wielu chorób występujących u ludzi [4]. Jednak sam mechanizm powstawania zmian patofizjologicznych pod wpływem tych wysoce reaktywnych cząsteczek nie został dotychczas jednoznacznie określony. Ponadto warto podkreślić, że anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, wytwarzane w ilościach fizjologicznych, spełniają użyteczną rolę w organizmie ludzkim, m.in. wykorzystują je fagocyty do zabijania wchłoniętych przez nie bakterii. Występując w niskich stężeniach,  $\text{O}_2^-$  oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  stymulują ponadto pro-

liferację komórek oraz mogą pełnić rolę wtórnego przekaznika w zjawiskach receptorowych [3].

Jedną z wczesnych zmian przedmiażdżycowych w ścianach naczyń jest akumulacja lipidów (w postaci zmodyfikowanej przez ROS frakcji LDL) przez makrofagi, w wyniku czego powstają komórki piankowate [18, 19]. W reakcjach wolnorodnikowych katalizowanych przez jony  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  powstają zmodyfikowane przez utlenianie cząstki LDL. W odróżnieniu od natywnych LDL cząstki utlenione są rozpoznawane przez receptory zmiatające (*scavenger receptors*) powierzchni makrofagów, przez co dochodzi do akumulowania w nich lipidów i formowania komórek piankowatych [20]. Utlenione LDL poprzez działanie chemotaktyczne powodują przyleganie krążących monocytów do ściany naczyń oraz zahamowanie migracji makrofagów ze ściany naczyń. Utlenione LDL wywierają działanie cytotoksyczne indukujące zmiany w nabłonku, co prowadzi do przerwania jego ciągłości i akumulowania na jego powierzchni monocytów i LDL oraz progresję zmian miażdżycowych.

Aby żelazo mogło katalizować reakcję Habera-Weissa, musi ono zostać uwolnione z białek wiążących (patrz wyżej), w kompleksie z którymi żelazo jest nietoksyczne. Ciekawe, że w niskich stężeniach askorbinian (przy wysokim stężeniu jest dobrym antyoksydantem) może wykazywać działanie prooksydacyjne i stymulować reakcje wolnorodnikowe. Askorbinian może redukować jony metali (np.  $\text{Fe}^{+3}$ ), a zredukowane jony metali — tlen. Takie cykle mogą się powtarzać, wytwarzając ROS. Powstający w stanie szoku tlenowego  $\text{O}_2^-$  uwalnia żelazo z ferrytyny, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  może uwolnić żelazo z hemu [13]. Hem uwalniany z ulegających lizie erytrocytów przedostaje się do komórek śródbłonka, w których uwalnianie jest żelazo hemowe, co może powodować szok tlenowy i uszkodzenia oksydacyjne [21]. Nie dochodzi do uwalniania żelaza z transferyny przy prawidłowym pH, jednak przy jego znacznym obniżeniu, co może mieć miejsce w ścianach naczyń, żelazo może być uwalniane z transferyny, indukując następnie utlenianie LDL [22].

### Uszkodzenia wolnorodnikowe DNA a miażdżyca

Obecnie, dość bogato jest udokumentowany udział ROS w procesie karcynogenezy [23, 24]. Ze względu na duży potencjał mutageny szczególne znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórki mogą mieć oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe DNA [24, 25]. Natomiast nieco uboższa jest dokumentacja dotycząca udziału ROS w patogenezie miażdżycy, chociaż i w tym wypadku nie brakuje danych w piśmiennictwie wskazujących na szok tlenowy jako jeden z czynników sprawczych tej patologii [26, 27]. W tym kontekście niezwykle intrygujące są hipotezy wskazujące na

podobne molekularne podstawy rozwoju obu schorzeń — plag chorobowych ubiegłego i zapewne obecnego stulecia. Wspólnym mianownikiem tych chorób mogą być mutacje. Od dawna wiadomo, że zmiany prowadzące do transformacji nowotworowej komórki mają charakter mutacji. Kilkanaście lat temu wysunięto hipotezę, że miażdżycy również może się rozwijać na tle zmian indukowanych uszkodzeniami DNA, utrwalonymi w postaci mutacji. Zmiany te prowadziłyby do patologicznej proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych, co w efekcie może przypominać rozwój guza łagodnego. Ostatnio pojawiły się, jeszcze skąpe, dane eksperymentalne potwierdzające słuszność tej hipotezy [28]. Jak wynika z danych opublikowanych pod koniec lat 90. ubiegłego stulecia, jednym z czynników mutagennych prowadzących do rozwoju blaszek miażdżycowych może być 8-oksy-2'-deoksyguanozyna [28]. Istnieją wyniki badań eksperymentalnych, które sugerują, że podwyższone stężenie 8-oksydG, obecne w uszkodzonej ścianie aorty pacjentów cierpiących z powodu zmian miażdżycowych, może być jednym z bezpośrednich czynników w rozwoju tego schorzenia [29]. Z badań przeprowadzonych przez autorów wynika, że stężenie 8-oksydG w limfocytach izolowanych z krwi 43 chorych na miażdżycę jest znacząco wyższe niż w DNA u osób z grupy kontrolnej (12,78 vs. 9,80 cząsteczek/10<sup>6</sup> cząsteczek dG). Należy przy tym pamiętać, że płytki miażdżycowe, oprócz innych składników, zawierają limfocyty [9].

Wiadomo, że 8-oksydG ma właściwości mutagenne i może powodować blok transkrypcji w komórkach ssaków [30]. Możliwe, że limfocyty, z wysokim stężeniem tej modyfikacji DNA, przylegające do płytki, mogą być włączone w proces inicjacji — promocji procesu chorobowego.

W FASEB Journal, ukazał się artykuł Collinsa i wsp. [29], w którym opisane badania wskazują na to, że ryzyko zgonów z powodu chorób serca w różnych krajach Europy koreluje z zawartością 8-oksydG w DNA limfocytów.

Utlonione LDL mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju zmian miażdżycowych [18, 19]. Interesujące są w tym aspekcie dane wskazujące, że utlonione cząsteczki LDL (nie dotyczy to niezmodyfikowanych cząstek) obniżają aktywność enzymów uczestniczących w szlaku naprawy DNA typu BER (naprawa przez wycinanie zasad) [31]. Ten mechanizm naprawy DNA odpowiada za wycinanie 8-oksyG z komórkowego DNA. Możliwe, że utlonione cząstki LDL, które bezpośrednio wiążą się z rozwojem zmian miażdżycowych (przez formowanie komórek piankowatych) mogą być również jednym z czynników odpowiedzialnych za wysokie stężenie

8-oksydG limfocytów krwi obwodowej obserwowane przez autorów niniejszego artykułu. We własnych badaniach klinicznych [9] podjęto próbę użycia metody fluorescencyjnej do oznaczenia stężenia żelaza w limfocytach krwi obwodowej u chorych na miażdżycę i u osób z grupy kontrolnej. Stężenie to było 2-krotnie wyższe w grupie pacjentów z miażdżycą. Metodą fluorescencyjną oznaczano stężenie wolnego żelaza w komórkach pacjentów. Z powyższych danych można wnioskować, że podwyższone stężenie żelaza może być czynnikiem inicjującym i promującym zmiany chorobowe, zatem przeprowadzone badania potwierdzałyby udział puli wolnego żelaza jako znaczącego czynnika w patogenezie miażdżycy.

Podwyższone stężenie wolnego żelaza w komórce wskazuje na możliwość tworzenia większych ilości rodnika OH, ale dopiero w wyniku reakcji tej niezwykle reaktywnej cząsteczki z DNA powstają mutagenne zmiany oraz utleniane są LDL. Potencjalnie mutagenne uszkodzenia DNA mogą, jak opisano wyżej, stać się przyczyną zarówno chorób nowotworowych, jak i zmian prowadzących do rozwoju miażdżycy.

Miażdżycy jest częstą przyczyną śmierci w wielu wysoko rozwiniętych krajach, gdzie co druga osoba umiera na zawał serca lub udar spowodowany zahamowaniem przepływu krwi w naczyniach o zwężonym świetle. Również w Polsce więcej niż połowa zgonów jest wynikiem zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Choroba ta początkowo w niezauważalny sposób postępuje przez wiele lat i w końcowej fazie jest przyczyną ograniczenia i skrócenia aktywności zawodowej ludzi w stosunkowo wczesnym okresie ich życia. Zatem zrozumienie molekularnego podłoża zmian prowadzących do miażdżycy jest jednym z kluczowych problemów leżących w polu zainteresowań biologii molekularnej i nauk klinicznych, a także instytucji społecznych.

## References

1. Emerit J, Beaumont C, Trivin F (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55: 333–339.
2. Oliński R, Jurgowiak M (1996) Reaktywne formy tlenu — uniwersalny czynnik patogenny? In: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T (ed.) Wydawnictwo Sorus. Poznań, 373–400.
3. Bartosz G (1995) Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.
4. Oliński R, Jurgowiak M (1999) Oksydacyjne uszkodzenia DNA (8-okso-dG) — biomarkerem niektórych chorób człowieka. *Kosmos*, 48: 329–338.
5. McCord JM (1998) Sem. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Hematology*, 35: 5–12.

6. Andrews NC (2000) Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews Genetics*, 1: 208–217.
7. Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W, Cabantchick ZI (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool in mammalian cells. *Anal Biochem*, 248: 31–40.
8. Bolann EJ, Ulvik RJ (1990) On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *Eur J Biochem*, 193: 899–904.
9. Gackowski D, Kruszewski M, Jawień A, Ciecierski M, Oliński R (2001) Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*, 31: 542–547.
10. Rossi E, Brendan M, McQuillan M, Hung J, Thompson PL, Kuek C, Beilby JP (2000) Serum ferritin and C282Y mutation of the hemochromatosis gene as predictors of asymptomatic carotid atherosclerosis in a community population. *Stroke*, 31: 3015–3020.
11. Sullivan JL (1981) Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*, 1: 1293–1294.
12. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Egge G, Poewe W (1997) In: Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis. Oberhollenzer F, Prospective results from the Bruneck study. *Circulation*, 96: 3300–3307.
13. de Valk B, Marx JJM (1999) Iron, atherosclerosis and ischemic heart disease. *Arch Intern Med*, 159: 1542–1548.
14. Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Runger G, Spogler F, Jarosch E, Oberhollenzer F, Willeit J (1994) Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Arterioscler Thromb*, 14: 1625–1630.
15. Roest M, van der Schouw YT, de Valk B, Marx JJ, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, Banga D (1999) Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular mortality in women. *Circulation*, 100: 1268–1273.
16. Sullivan JM (2002) Stored iron and myocardial perfusion deficits. (Manuskrypt).
17. Looker AC, Johnson CL (1998) Prevalence of elevated serum transferrin saturation in adults in United States. *Ann Intern Med*, 129: 940–945.
18. Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 272: 20963–20966.
19. Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785–1792.
20. Hazen SL (2000) Oxidation and atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*, 28: 1683–1684.
21. Vercelotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS (1994) Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induced antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 22: 207–213.
22. Leake DS (1997) Does an acid pH explain why low density lipoprotein is oxidized in atherosclerotic lesions? *Atherosclerosis*, 129: 149–157.
23. Halliwell BM, Gutteridge JM (1999) *Free radicals in biology and medicine* (3<sup>rd</sup> ed.) New York; Oxford Science Publications.
24. Oliński R, Jurgowiak M (1999) Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenyzy i karcynogenyzy. *Post Biochem*, 45: 50–58.
25. Oliński R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) Base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett*, 193: 193–198.
26. Lipiński P, Drapier JC, Oliveira L, Breuer W, Cabantchick I (2000) Intracellular iron status as a hallmark of mammalian cell susceptibility to oxidative stress: a study of L5178Y mouse lymphoma cell lines differentially sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Blood*, 95: 2960–2966.
27. Singh RB, Ghosh S, Niaz MA, Singh R, Beegum R, Chibo H, Shuomin Z, Postiglione A (1995) Dietary intake, plasma levels of antioxidant vitamins, and oxidative stress in relation to coronary artery disease in elderly subjects. *Am J Cardiol*, 76: 1233–1238.
28. de Flora S, Izzotti A, Walsh D, Degan P, Petrilli GL, Lewtas J (1997) Molecular epidemiology of atherosclerosis. *FASEB J*, 11: 1021–1031.
29. Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Belizzi M (1998) Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries and correlation with heart disease mortality rates. *FASEB J*, 12: 1397–1400.
30. Le Page F, Kwok EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine, requirement for XPG, TFIIH, and CSB, and implications for Cockayne Syndrome. *Cell*, 101: 158–171.
31. Chen KH, Srivastava DK, Singhal DK, Jacob S, Ahmed AE, Wilson SH (2000) Modulation of base excision repair by low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and antioxidants in mouse monocytes. *Carcinogenesis*, 21: 1017–1022.