

Nové poznatky o metabolismu železa

M. Šimek

Hematologicko-transfuziologické oddelenie Fakultnej nemocnice, Nitra, Slovenská republika, prednosta prim. MUDr. E. Kružliaková

Souhrn: Článek komplexně shrnuje nové poznatky metabolismu železa. Postupně je probrána resorpce železa buňkou, enterocyty a pohyb v organismu s dalším využitím pro potřeby organismu. Pro správné pochopení poruch metabolismu železa je důležité porozumět nejen jednotlivým dějům při zpracování železa, ale i jejich regulačním mechanismům, které efektivně udržují homeostázu železa v organismu.

Klíčová slova: metabolismus – železo – transferinový receptor

Novel findings on iron metabolism

Summary: The article comprehensively summarises novel findings on iron metabolism. Iron resorption by the cell, by the erythrocytes and circulation in the body with further utilisation for the body needs is reviewed step by step. For proper understanding to iron metabolism disorders it is important to understand not only to individual processes in iron processing but also to their regulatory mechanisms that effectively keep iron homeostasis in the body.

Key words: metabolism – iron – transferrin receptor

Úvod

Abychom správně pochopili patogenезi chorob při poruchách metabolismu železa, je důležité poznat význam a transport železa v organismu a regulační mechanismy, které zajišťují jeho rovnovážný stav.

Ionty železa jsou nevyhnutelné pro všechny formy života, protože se účastní na transportních systémech v dýchacím řetězci. U živočichů má kromě toho železo významnou úlohu při reverzibilní vazbě a uvolňování molekulárního kyslíku. Železo má schopnost snadno přijímat a odevzdávat elektrony a přecházet z redukované (Fe^{2+}) na oxidovanou formu (Fe^{3+}). Tato schopnost tvoří důležitou součást cytochromů a sloučenin, na které se váže kyslík (hemoglobin, myoglobin) a mnoho dalších enzymů. Nicméně, samotné železo je velice toxické a může poškodit tkáň přeměnou peroxidu vodíku na volné radikály, které toxicky působí na buněčné membrány, proteiny a DNA. Aby k takovým pochodům nedocházelo, jsou syntetizovány proteiny výhradně určené pro transport a skladování železa. Tyto proteiny mají vy-

sokou afinitu k železu a za fyziologických podmínek nemají obsazena všechna místa pro železo.

Mezi hlavní procesy zodpovědné za regulaci homeostázy železa u savců řadíme resorpci železa z potravy, jeho transport mezi orgány, resorpci a utilizaci v jednotlivých buňkách. Za tyto procesy zodpovídá řada proteinů, které zajišťují jejich bezpečnost a efektivnost. Na druhé straně mnoho dalších okolností, jako je hladina hormonů, růstových faktorů, cytokinů, ale i stav proliferace a diferenciace jednotlivých buněk, ovlivňuje celkový metabolismus železa.

Homeostáza železa v buňce

Každá buňka má vybudovaný systém regulačních procesů, které zabezpečují homeostázu železa a omezují jeho nežádoucí účinky. V této regulaci hrají klíčovou úlohu regulační cytoplazmatické proteiny železa (IRPs – iron regulatory proteins), známé jako IRP1 a IRP2, které „monitorují“ hladiny železa v buňce a regulují syntézu proteinů zodpovědných za homeostázu železa.

Regulace železa na úrovni buňky je založena hlavně na stupni exprese genu pro feritin a transferinový receptor 1 (TfR1), které regulují rovnováhu železa. Úlohou TfR1 je přenos transferinu (Tf) s navázanými dvěma molekulami Fe^{3+} přes buněčnou membránu. Počet TfR1 na povrchu buňky je regulovaný aktuálním stavem železa a proliferativním stavem buňky. Další neméně důležitou úlohu má TfR1 navázaný na prekursor enterocytů, kde monitoruje množství železa v organismu a reguluje resorpci z potravy.

Koncem minulého století byla objevena i druhá forma transferinového receptoru, transferinový receptor 2 (TfR2), jehož úloha nebyla dosud úplně objasněna. Velký počet TfR2 nacházíme hlavně na povrchu hepatocytů, kde je minimální množství TfR1. Naopak u erytroblastů převažuje TfR1 nad TfR2. Předpokládá se, že úlohou TfR2 je regulace resorpce železa do hepatocytů, a jeho mutace je jednou z příčin hereditární hemochromatózy typu 3.

Protože volné železo má tendenci katalyzovat volné radikály, byly vy-

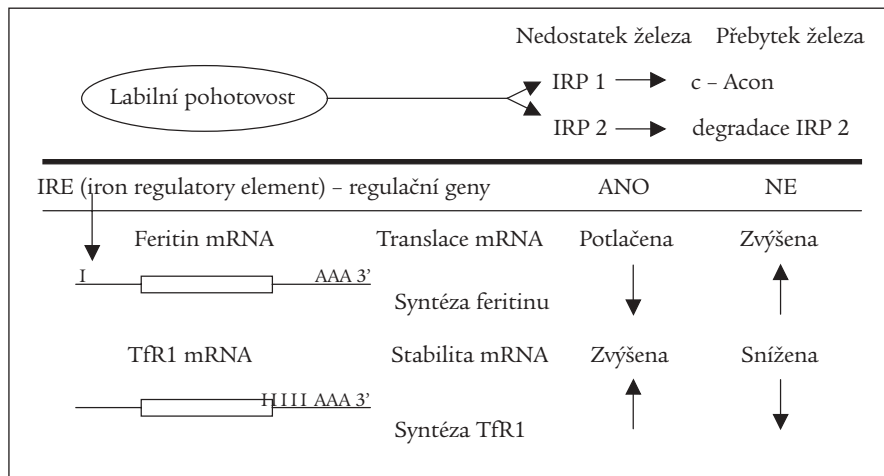


Schéma 1. Regulace translace feritinu a transferinového receptoru 1 (TfR1) prostřednictvím IRPs.

IRP1 – regulační protein železa 1; IRP2 – regulační protein železa 2; IRE – regulační gen mRNA; m-acon – mitochondriální akonitáthydratáza; mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina; TfR1 – transferinový receptor 1

tvořeny mechanismy, které železo bezpečně uchovávají. Nadbytečné železo je nejčastěji uloženo v cytoplasmě ve formě solubilního feritinu nebo hemosiderinu, který je agregovaný do větších komplexů a je méně rozpustný než feritin.

Objasněním centrální úlohy regulačních proteinů železa – IRPs a regulačních genů – IREs (iron responsive elements), na které se váží IRPs a ovlivňují syntézu feritinu a TfR1, přineslo důležitý krok k poznání intracelulární regulace železa, a s tím i celkové homeostázy železa v organismu (schéma 1).

IRPs jsou specifické proteiny, které se nacházejí v buněčné cytoplasmě všech savců. Svou vazbou na mRNA regulují translaci proteinů spojených s metabolismem železa. Při nedostatku železa mají IRPs zvýšenou afinitu k IREs, zvyšují syntézu TfR1, a naopak blokují proteosyntézu feritinu. V případě nadbytku železa v buňce je afinita IRPs k IREs snížena a syntéza feritinu je upřednostněna. Tento mechanismus zabezpečuje efektivní rovnováhu železa v buňce a ukazuje, že IRPs jsou prvotními regulátory hemostázy železa v buňce.

IREs mRNA jsou složeny z 28 nu-

kleotidů a mají sekundární strukturu ve formě stopky složené z konstantní sekvence nukleotidů CAGUGX, v níž X je obvykle U nebo C, ale může být i A [1]. IREs se nacházejí na mRNA feritinu nebo TfR1, kde za pomoci IRPs regulují translaci nebo stabilitu mRNA. Feritinová mRNA obsahuje jeden IRE na 5'-konci, která po navázání IRPs blokuje translaci feritinu. TfR1 mRNA má až pět IREs (iron regulatory elements) na svém 3'-konci, které po navázání IRPs zabraňují působení ribonukleáz a zvyšují stabilitu mRNA.

Od roku 1988, kdy byly objeveny IRPs, už bylo patrné, že afinita mezi IRPs a IRE závisí na mnoha dalších faktorech. Kromě stavu železa je afinita ovlivněna oxidem dusnatým, fosforylací prostřednictvím protein kinázy C, stresem, hypoxií a změnami v proliferaci nebo diferenciaci buňky. Všechny tyto faktory ovlivňují IRPs a mají vliv na metabolismus železa. Později byly objeveny dva velmi podobné IRPs, IRP-1 a IRP-2, jejichž poměr je různý podle typu buňky [2]. Převahu IRP-1 nacházíme v játrech, ledvinách, střevě, mukóze a nervovém systému, IRP-2 jsou více zastoupeny v hypofýze a B-lymfocy-

tech. IRP-1 sdílí homologní strukturu s mitochondriální akonitáthydratázou (m-acon), která konvertuje citrát na izocitrát v mitochondriích.

IRP-1 je aktivován a stabilizován tzv. labilní pohotovostí, která je tvořena shlukem 4 atomů železa a cysteinu [4Fe-4S]. Na základě těchto zjištění má IRP-1 dvojí funkci: ovlivňuje syntézu regulačních proteinů metabolismu železa nebo působí jako cytoplazmatická akonitáthydratáza (c-acon). Shluk železa a cysteinu c-acon je labilní, který se v přítomnosti kyslíku nebo jiných činitelů reverzibilně přemění na formu o 3 atomech železa a 4 atomech cysteinu [3Fe-4S]. Tato konverze určuje aktivitu vazby IRP-1 na IRE regulačních proteinů. Při přebytku železa v buňkách, IRP-1 obsahuje shluk 4 atomů železa a cysteinu [4Fe-4S] a v této formě přebírá úlohu c-acon a snižuje vazbu IRP-1 na IREs (obr. 1). V případě nedostatku železa, v IRP-1 je přítomen shluk 3 atomů železa a 4 atomů cysteinu [3Fe-4S] a IRP-1 se váže na IRE s vyšší intenzitou.

Přechodné formy mezi c-acon a formou, která se váže na IRE, jsou tedy regulovány posttranslačně v závislosti na aktuálním stavu železa v buňce a beze změny v celkovém množství IRP-1.

Další regulační protein, IRP-2, je asi z 57 % shodný ve složení aminokyselin s IRP-1, váže se na IRE podobně jako IRP-1 a po navázání potlačuje translaci mRNA. V kontrastu k IRP-1 IRP-2 funguje pouze jako specificky se vážící protein na IRE, kterému chybí enzymatická aktivita. Jeho regulace je zprostředkována protein-kinázou C, která při nedostatku železa fosforyluje IRP-2. IRP-1 také zvyšuje intenzitu vazby tohoto proteinu na IRE. Naopak při nadbytku železa je IRP-2 rozrušen oxidací prostřednictvím nadbytečného železa.

Na základě uvedených poznatků můžeme prohlásit, že regulace železa v buňce je založena na vazbě IRPs a IRE. Chybí-li buňce železo, IRP-1

se transformuje do formy s vysokou afinitou na IREs, váže se na IRE na 5'-konci feritinové mRNA a potlačuje translaci feritinu.

Zajímavá situace vznikne při chronickém zánětu, při kterém aktivovaná cytokinová síť způsobuje relativní sideropenii a zvýšené ukládání železa v makrofázích. Přesný mechanismus porušené homeostázy není dosud přesně znám, ale pro-zánětové a proti-zánětové cytokiny působí zejména na makrofágy, které mají v tomto ději klíčové postavení. Práce Ludwiczekové [3] dokázala na THP-1 a U937 buněčných liniích monocytů sníženou hladinu TfR1 a resorpci železa při působení IFN- γ a lipopolysacharidu (pro-zánětové cytokiny), naopak při působení IL-10 (protizánětový cytokin) zvýšenou hladinu TfR1. IFN- γ a lipopolysacharidy také v závislosti na dávce zvyšují syntézu DMT-1 a stimulují resorpci železa do makrofágu bez pomoci TfR1, která se manifestuje jako relativní sideropenie a anémie chronických nemocí (ACHN). Zároveň se zvýšenou resorpcí snižují syntézu F/I/M (Ferroportin1/Ireg1/MTP1) a vylučování železa. Celý proces směřuje k nadměrnému ukládání železa do makrofágů bez regulace IPRs a je závislý pouze na aktivitě pro-zánětových cytokinů. Proti-zánětový cytokin IL-10 ovlivňuje syntézu TfR1 a spolu s IRPs působí přesně opačně. Regulace metabolismu železa cytokiny je tedy klíčovým patomechanismem u anémií chronických nemocí (ACHN) a na jeho základě slibuje cílenější léčbu, než je tomu doposud.

Resorpce železa

Hlavním místem vstřebávání železa je duodenum, pouze malá část železa se resorbuje v distálních částech tenkého střeva. Železo se vstřebává v iontové formě (Fe^{2+} , Fe^{3+}) nebo jako součást hemu, které je lépe vstřebatelné. Organismus musí monitorovat svoje zásoby železa a přiměřeně odpovídat změnou resorpce, která je

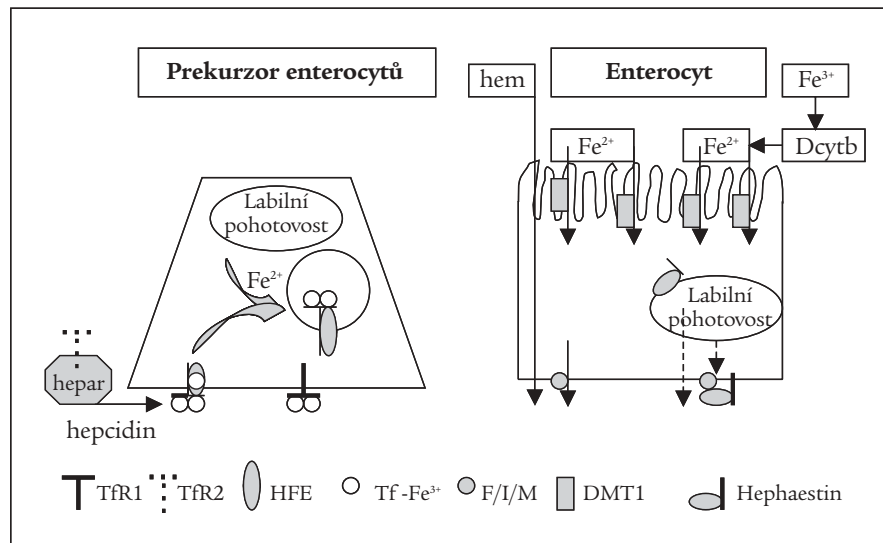


Schéma 2. Resorpce Fe^{2+} , Fe^{3+} a hemu enterocyty.

Dcytb – duodenální cytochrom b; F/I/M – Ferroportin1/Ireg1/MTP1; DMT1 – přenašeč železa přes apikální membránu; TfR1 – transferinový receptor 1; Tf- Fe^{3+} – komplex transferinu a trojmocného železa

efektivně kontrolována oproti exkreci. Nejdůležitějším kontrolním uzlem v homeostáze železa u vyšších živočichů jsou enterocyty duodena, které jsou schopny zachytit změny aktuálního stavu železa v organismu a dle požadavků zvýšit, nebo snížit resorpci železa [4]. Tyto informace dostávají enterocyty prostřednictvím signálů, které odrážejí aktuální stav zásob železa. Ačkoliv žádný signál dosud nebyl úplně objasněn, předpokládá se několik „regulátorů“, které se podílejí na rovnováze metabolismu železa v organismu.

V kryptách duodena se nacházejí prekurzorové enterocyty, které nedokáží resorbovat železo, pouze monitorují potřebu železa v organismu. Některé z nich proliferují a putují na klky, kde se diferencují v enterocyty a specializují se na resorpci železa podle aktuálního stavu železa v organismu. Tyto enterocyty už obsahují přenašeče, které umožňují resorpci železa přes apikální membránu enterocytů, jeho skladování a transport přes bazolaterální membránu k dalšímu využití.

Prekurzorové buňky v duodenálních kryptách oproti diferencovaným enterocytům produkují odlišné pro-

teiny spojené s transportem železa (schéma 2). Monitorace aktuálního stavu železa se děje v prekurzorech enterocytů pomocí komplexu TfR1 a HFE (TfR1-HFE), který umožňuje resorpci železa z Tf do labilní pohotovosti. Tato pohotovost následně ovlivňuje aktivitu IRPs, které regulují translaci kromě TfR1 a feritinu i DMT1 (divalent metal transporter 1) a F/I/M (Ferroportin1/Ireg1/MTP1), které se účastní na resorpci a vylučování železa v enterocyty.

Úloha HFE je úzce vázána k TfR1 a podílí se na resorpci železa do enterocytů i do ostatních buněk. HFE redukuje afinitu TfR1 k Tf a soutěží s ním o vazebné místa na TfR1. Gen pro HFE protein se nachází na krátkém rameni 6. chromozomu a svojí strukturou se podobá HLA-glykoproteinům I. třídy. Skládá se ze 3 extracelulárních domén ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), z toho doména $\alpha 3$ se nekovalentně váže s β_2 -mikroglobulinem.

Úzký vztah HFE s TfR1 při resorpci železa a jeho lokalizace na bazolaterální straně prekurzorových enterocytů v kryptách duodena určuje HFE jako senzor celkového stavu železa v organismu spolu s Tf a TfR1 [5]. Mechanismus, jakým

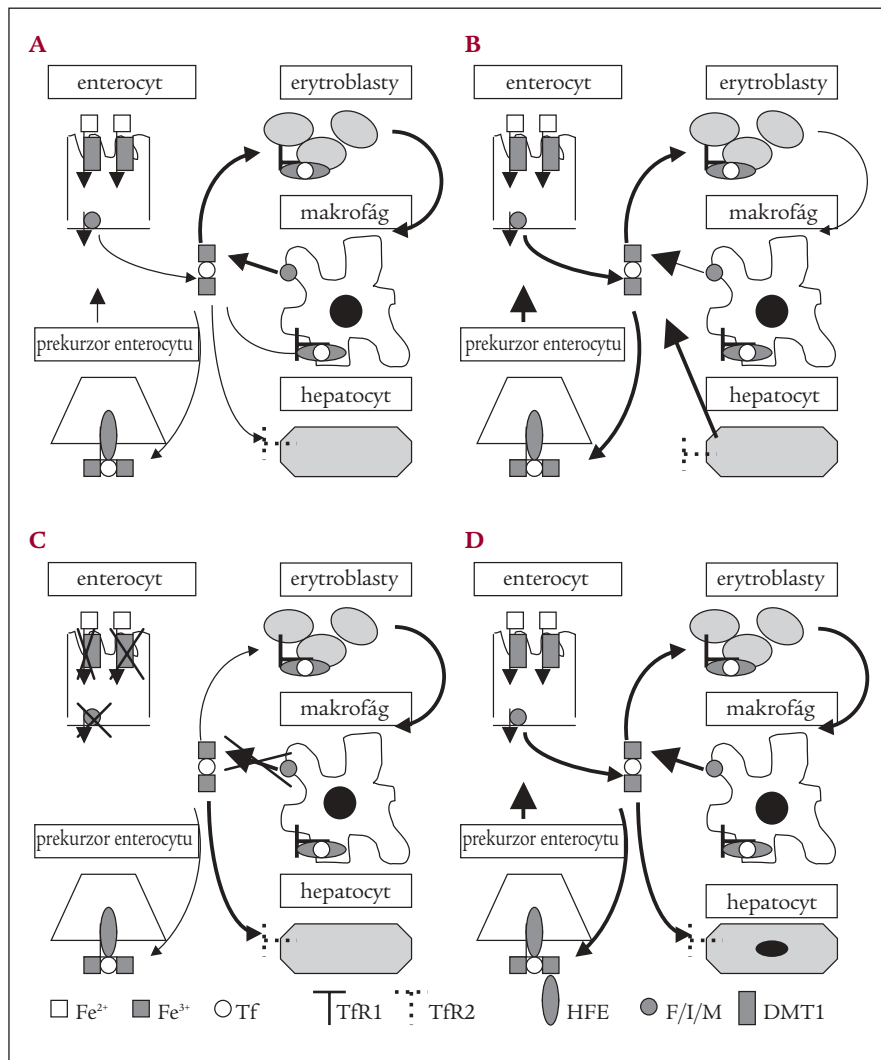


Schéma 3. Fyziologická distribuce železa za fyziologických podmínek (A), při nedostatku železa (B), anémii chronických chorob (C) a hemochromatóze (D).

F/I/M – Ferroportin1/Ireg1/MTP1; DMT1 – přenašeč dvojmocného železa; TfR1 – transferrinový receptor 1; TfR2 – transferrinový receptor 2; Tf – transferrin

HFE monitoruje hladinu železa, není dosud objasněn, za možný signál se považuje hepcidin syntetizovaný játry. Bylo pozorováno, že při snížení jeho hladiny dochází ke zvýšení resorpce enterocyty jako při nedostatku HFE nebo β_2 -mikroglobulinu.

Z těchto poznatků plyne i patofyziologický mechanismus hereditární hemochromatózy, pro kterou je charakteristická nadměrná resorpce železa z potravy a přetížení organismu železem v důsledku mutace HFE genu. Mezi nejdůležitější mutace patří záměna tyrozinu za cystein v pozici

282 (C282Y), která změní strukturu $\alpha 3$ -domény a neumožní navázání β_2 -mikroglobulinu [20]. Změněný HFE-protein se pevněji naváže na TfR1 a neumožní resorbovat železo z transferrinového komplexu do labilní pohotovosti prekurzorového enterocytu. Další mutace HFE-genu, záměna kyseliny asparagové za histidin v pozici 63 (H63D), má malý vliv na metabolismus železa a je velmi vzácná. Často se vyskytuje s mutací C282Y a nabývá klinickou manifestaci.

Při postupné diferenciaci prekurzorových buněk jsou syntetizované

specifické proteiny podílející se na resorpci železa a hephaestin (schéma 2). Enterocyty resorbují železo z potravy prostřednictvím apikální membrány, která se specializuje na transport hemu a dvojmocné formy železa (Fe²⁺) dvěma různými transportními procesy. Trojmocné železo (Fe³⁺) se musí nejdříve redukovat na Fe²⁺ pomocí duodenálního cytochromu b (Dcytb). Železo vázané ve formě hemu je lépe vstřebatelné enterocyty, ale mechanismus transportu dosud není objasněn. Lépe prozkoumaná je resorpce pomocí dvojmocného přenašeče DMT1 (předtím nazývaného Nramp2 nebo DCT1), který přenáší Fe²⁺ přes apikální membránu enterocytů. Struktura, funkce a regulace DMT1 byla popsána nedávno [6,7]. DMT1 je protonová pumpa složená z 12 domén, která transportuje kromě Fe²⁺ i další dvojmocné formy kovů z lumen střeva do enterocytů. DMT1 je kódován dvěma mRNA (izoforma I, II). Mediátorová RNA izoforma I obsahuje IRE, která reguluje syntézu DMT1. Izoforma II syntetizuje protein, na jehož C-konci je místo IRE nahrazeno 25 aminokyselinami a nepodléhá regulaci IRPs. Izoforma I se nachází v enterocytech, kde se podílí na resorpci železa a je regulována prostřednictvím vazby IRE a IRPs podle celkových zásob železa. Syntéza izoformy I DMT1 je omezená v kryptách duodena na prekurzorech enterocytů. S postupnou diferenciací enterocytů dochází ke zvýšené syntéze v závislosti na aktuálním stavu železa v organismu.

Naopak izoforma II se nachází hlavně na prekurzorech erytrocytů, kde se podílí spolu s TfR1 na přenosu železa a syntéza je regulovaná hladinou endogenního erythropoetinu (eEpo).

Bazolaterální membrána slouží k transportu železa z enterocytů do krevního oběhu. Železo, které není přeneseno, se skladuje ve formě feritinu a vylučuje se exfoliací enterocytů. Hlavní úlohu v transportu přes

bazolaterální membránu u diferencovaných enterocytů hraje přenašeč Ferroportin1/Ireg1/MTP1 (F/I/M), který vyžaduje další přídatný protein hephaestin. Tento protein je podobný ceruloplazminu, jak dokázaly genetické studie na myších [8]. Lokalizace F/I/M na buňkách a tkáních je závislá na potřebě exkrece železa. V duodenu je F/I/M umístěn na zralých enterocytech a chybí v kryptách na prekurzorech enterocytů. Tento protein se také nachází v játrech, hlavně v Kupfferových buňkách, v nichž je skladováno železo z potravy a rozpadlých erytrocytů. Další specifické umístění je na trofoblastech placenty, kde reguluje přenos železa mezi matkou a plodem. Mediátorová RNA F/I/M obsahuje IRE na 5'-konci, která váže IRPs a má stejnou strukturu jako IRE na 5'-konci pro feritin.

Proces, který navazuje na přenos železa přes bazolaterální membránu, je oxidace železa dvojmocné formy na trojmocnou. Předpokládá se, že hephaestin je odpovědný za tento proces. Vysoká podobnost s ceruloplazminem dává předpoklad správného přenosu železa mezi zásobní a transportní formou. Měď je nezbytná pro efektivní transport železa z buňky a je možno ji považovat za regulační prvek. Zatím nebylo dořešeno, zdali je hephaestin pouze součástí přenašeče na bazolaterální membráně nebo dalších přenašečů. Mechanismus, jakým hephaestin spolupracuje s F/I/M, nebyl objasněn. Hephaestin se nachází hlavně na zralých enterocytech, prekurzory enterocytů hephaestin neobsahují. Imunologickým stanovením byla dokázána přítomnost hephaestinu v Golgihio aparátu, v němž se podílí na přenosu železa mezi membránou buňky a organely podobně jako TfR1.

Posledním krokem vstřebávání železa enterocyty je vazba dvou molekul Fe^{3+} na apotransferin, který přenáší železo k cílovým buňkám.

Absorpce železa je regulována několika způsoby, avšak přesný molekulární mechanismus nebyl popsán ani u jednoho z nich. Při poklesu množství zásobního železa, které se nachází v játrech, svalech a krvi pod kritickou hranici, zvýší zásobní regulátor resorpce železa z potravy [9], ale jen do určitého stupně. Přesné molekulární detaily nejsou dosud známy, ale pravděpodobně se proces odehrává v kryptách duodena, v nichž je diferenciací prekurzorů enterocytů v enterocyty, které se specializují na vstřebávání železa, závislá na saturaci TfR1 železem. TfR-1, solubilní forma TfR1 (sTfR) nebo Tf, považujeme všeobecně za možné kandidáty na „zásobní“ regulátor. Nedávno se však objevil další kandidát – hepcidin, který byl objeven náhodně Krausem [10] a Parkem [11] při hledání nových antibakteriálních peptidů. Jedná se o peptid složený z 20, 22 nebo 25 aminokyselin s antibakteriální a antimykotickou aktivitou, jehož syntéza probíhá výhradně v játrech. Na mRNA hepcidinu nebyly nalezeny žádné IREs, proto je jeho regulace zatím nejasná. Hladina hepcidinu se zvyšuje při nadbytku železa v organismu a aktivaci prozáněťových cytokinů, hlavně IL-1, IL-6 a TNF α [21]. Tato reakce následně redukuje aktivitu DMT1 přenašeče na apikální membráně enterocytů, snižuje resorpci železa z potravy a indukují zvýšené ukládání železa do makrofágů. Je pravděpodobné [12], že TfR-2 při těchto stavech resorbují železo do hepatocytů, které syntetizují hepcidin ve zvýšené míře a ve spojení s komplexem HFE-TfR1 snižují resorpci železa (schéma 2). Celý proces ústí do tzv. funkčního nedostatku železa, při němž je v organismu relativní nadbytek zásobního železa, ale na druhé straně nedostatek železa pro potřeby erytropézy (schéma 3c). Jedná se o reverzibilní změnu v metabolismu železa, která se po odeznění cytokinové odpovědi vrací do původního stavu. Naopak při nedostatku

železa v organismu (schéma 3b) se snižuje syntéza hepcidinu, zvyšuje se resorpce železa z potravy a sekrece zásobního železa z makrofágů.

Množství železa přijatého potravou, tzv. „výživový“ regulátor, je druhý regulátor resorpce železa. Bylo zjištěno, že několik dní po zvýšeném příjmu železa potravou nejsou enterocyty schopny resorbovat větší množství železa. Tento fenomén je pravděpodobně výsledkem akumulace intracelulárního železa, který omezuje přes IRE, resorpci.

Třetí regulační mechanismus je znám jako „erytropoetický“ regulátor [13], který odráží požadavky při zvýšené erytropoéze. Erytropoetický regulátor má větší schopnost zvýšit resorpci železa než zásobní regulátor. Je logické, že samotný erytroblast by měl mít možnost ovlivnit resorpci, ale mechanismus, jakým se daný proces reguluje, není dosud znám. Erytropoetický regulátor je pravděpodobně tvořen solubilním signálem, který je nesen plazmou z kostní dřene k enterocytům. Je zajímavé, že kromě anémie z nedostatku železa (SA) byla popsána zvýšená resorpce železa u talasemie, kongenitální dyserythropoetické anémie a sideroblastické anémie. Jedná se o skupinu anemií, které jsou etiologicky spojené s poruchou syntézy hemu nebo globinu, a tedy i metabolismem železa v organismu. Na druhé straně mnoho dalších anemií se zvýšenou erytropoézou jako hereditární sférocytóza, autoimunitní hemolytická anémie (AIHA), sprkviťatá anémie, nejsou doprovázeny zvýšenou resorpcí železa z potravy.

Poslední možný regulátor je hypoxie [14], ale zdali je mechanismus regulace od uvedených regulátorů odlišný, není dosud známé.

Pohyb železa v organismu

Mechanismus, jakým je železo dopraveno přes cévní stěnu do krve, není dosud objasněn. Trojmocné železo (Fe^{3+}), které dosáhlo krevní oběh, se váže na apotransferin a je vychytává-

no buňkami prostřednictvím transferinových receptorů.

Je zajímavé, že pacienti s vrozenou atransferinemí, která je velmi vzácná, mají přítomnu těžkou anémii z nedostatku železa, ale laboratorně i klinicky je přítomno přetížení organismu železem. Z toho plyne, že pouze erytroblasty vyžadují k resorpci komplex Tf-Fe³⁺, ostatní buňky dokáží využít i jiné cesty resorpce molekuly železa, které dosud nebyly objeveny. Největší část resorbovaného železa je transportována k erytroblastům pro syntézu hemu a hepatocytům, v nichž je železo uskladněno pro potřeby organismu ve formě feritinu (schéma 3a). Erytroblasty potřebují 20 mg molekulárního železa denně, ale pouze 1–2 mg železa za fyziologických podmínek je vstřebáno z potravy. Z těchto důvodů je železo získáno z makrofágů, které odstraňují poškozené erytrocyty, a opět použito pro erythropoézu. Říkáme, že tento díl z celkového množství železa v organismu je v tzv. metabolickém pohybu. Menší část resorbovaného železa je vychytávána ostatními buňkami pro syntézu myoglobinu a enzymů, které vyžadují přítomnost molekuly železa a tvoří tzv. nemetabolické železo.

Zároveň se syntézou hemoglobinu a spotřebováváním přijatého železa probíhá v organismu rozpad starších erytrocytů s uvolněním hemoglobinu, který podléhá metabolickým změnám a uvolnění molekuly železa na další využití. K rozpadu erytrocytů může docházet uvnitř cévního systému nebo pohlcením makrofágy mimo cévní systém. Většina hemoglobinu uvolněného v cévním systému se váže na bílkovinný nosič haptoglobin, který váže hemoglobin ve stechiometrickém poměru (1 : 1) a vzniká hemoglobin-haptoglobinový komplex. Rozpadá-li se větší množství erytrocytů v cévním systému, hemoglobin vysytí kapacitu haptoglobinu. Volný hemoglobin se dostává do glomerulárního filtrátu,

z kterého je resorbován epitelem proximálního tubulu. Při překročení této rezervní kapacity se hemoglobin dostává do moči a dává vznik hemoglobinurii. Část hemoglobinu v krevním řečišti se oxiduje na methemoglobin. Molekula Fe²⁺ přechází na Fe³⁺ a z molekuly methemoglobinu jsou uvolněny globinové řetězce. Oxidovaná hemová část – hematin je navázán na hemopexin. Při nasycení hemopexinu se zbylý hematin naváže na albumin, který je vychytáván ledvinami a je potenciálně nefrotoxický.

Makrofágy je vychytáván haptoglobinový komplex a hemopexin spolu s erytrocyty v játrech, slezině a kostní dřeni, v nichž dojde k rozpadu a otevření porfyrinového kruhu a uvolnění molekuly železa a globinu. Oxidací metinových skupin (–CH) porfyrinového kruhu vzniká biliverdin a jeho redukcí žlučové barvivo bilirubin, který je vylučován makrofágy. V krevním oběhu se naváže na albumin a v plazmatickém retikulu hepatocytu je z větší části navázán na kyselinu glukuronovou a vylučován žlučí z organismu.

Uvolněné železo je vychytáváno Tf a je přenášeno k erytroblastům nebo uskladněno v makrofázích ve formě feritinu nebo hemosiderinu. Určité malé množství odchází močí, stolicí a v odloupaných endoteliích.

Nejdůležitější regulační prvky pohybu železa v organismu jsou enterocyty a makrofágy, které monitorují stav železa v organismu a ovlivňují jeho hladinu.

Při nedostatku železa nízká hladina nasyceného transferinu signalizuje makrofágům, aby ve zvýšené míře uvolňovaly železo ze zásob (schéma 3a). Klesá labilní pool v prekurzorech enterocyty a prostřednictvím IRPs se zvyšuje syntéza proteinů, které se účastní vstřebávání železa v enterocytech. Naopak při sekundárním přetížení železem (transfuze, parentální léčba železem) makrofágy ukládají přebytečné železo do zásob ve formě feritinu a prekurzory entero-

cytů omezují syntézu transportních proteinů.

U ACHN prostřednictvím aktivace makrofágů sítí cytokinů dochází ke kumulaci železa v elementech monocytárního-makrofágového (Mo-Ma) systému a sníženému uvolňování a vazbě na Tf. Tyto procesy vedou k poklesu hladiny sérového železa (FeS) a snížení dostupnosti železa pro potřeby erythropoézy (schéma 3c). Signály určené pro prekurzory enterocyty informují o dostatku železa v organismu, dochází k redukci specifických přenašečů železa přes apikální a bazolaterální membránu enterocyty a z toho plynoucí snížení resorpce železa enterocyty [15].

Specifická situace nastává při hereditární HFE-hemochromatóze, při které je poškozena regulace na úrovni HFE/TfR1. Makrofágy a prekurzory enterocyty prostřednictvím mutace HFE-genu a defektní tvorby HFE-TfR1-komplexu dostávají falešný signál o nedostatku železa v organismu i přes jeho normální nebo zvýšenou hladinu (schéma 3d). Důsledkem je zvýšená resorpce železa přes DMT1-přenašeč na apikální membráně zralých enterocyty. Následně se předpokládá proloupaná stimulace aktivity F/I/M na bazolaterální membráně enterocyty a odsunu železa z enterocyty do cirkulace. Podobná situace nastává i na úrovni makrofágů, které také dostávají falešný signál o nedostatku železa v organismu pro poruchu regulace HFE-TfR1 komplexu. Tato porucha zvyšuje syntézu F/I/M na membráně makrofágy, který vylučuje železo i při normálních nebo zvýšených hladinách zásobního železa. Nadbytečné železo působí v ostatních orgánech toxicky a vede k multiorgánové dysfunkci (cirhóza jater, diabetes, kardiomyopatie). Na vzniku hereditární hemochromatózy se nemusí podílet jen mutace HFE, ve světě byly popsány i mutace genu pro TfR2 nebo F/I/M, které také vedly k nadbytku železa v organismu.

Resorpce celulárního železa

Až 4/5 železa navázaného na Tf získávají prekurzory erytrocytů pouze prostřednictvím TfR1. Ostatní buňky využívají za fyziologických podmínek také tento receptor, ale mohou uplatnit i jiné mechanismy přenosu železa přes buněčnou membránu [16].

Současný model buněčné resorpce železa, tzv. transferinový cyklus, jakým buňka získává železo z Tf, ukazuje obr. 4.

Tf, který nese 2 molekuly Fe^{3+} , se naváže na TfR1 na povrchu buňky. Afinitu mezi Tf a TfR1 reguluje HFE, jako je tomu i při resorpci železa v enterocytech. Další proces je energeticky závislý, dochází při něm k vychlípění části buněčné membrány spolu s Tf- Fe^{3+} -TfR1[\pm HFE] komplexem dovnitř buňky a postupně tvorbě endosomu, který se po odchlípení nachází volně v cytoplazmě. Železo se uvolňuje z komplexu při teplotně a energeticky náročném procesu, který je nutný pro acidifikaci endosomu a uvolnění Fe^{3+} z Tf. Laboratorně však ani $\text{pH} < 5,3$ nevede k uvolnění obou molekul železa z Tf a v současné době se uvažuje o dalších zatím neznámých faktorech, které se podílejí na uvolnění železa z tohoto komplexu. Předpokládá se, že i samotný TfR1 se podílí na uvolnění železa [17]. Uvolněné Fe^{3+} je redukováno na Fe^{2+} a přeneseno pomocí transportního proteinu DMT1 přes membránu endosomu do labilní pohotovosti. Po uvolnění železa z endosomu se TfR1 opět dostává na povrch buňky, váže další Tf a celý cyklus se uzavírá.

Speciálním typem resorpce železa je fagocytóza erytrocytů makrofágy ve slezině, kostní dřeni a játrech. V makrofázích se železo uvolňuje z hemu za pomoci hem-oxidázy a je přeneseno přes intracelulární membránu prostřednictvím přenašeče Fe-ATPázy. Mechanismus uvolnění železa z makrofágu zatím není úplně

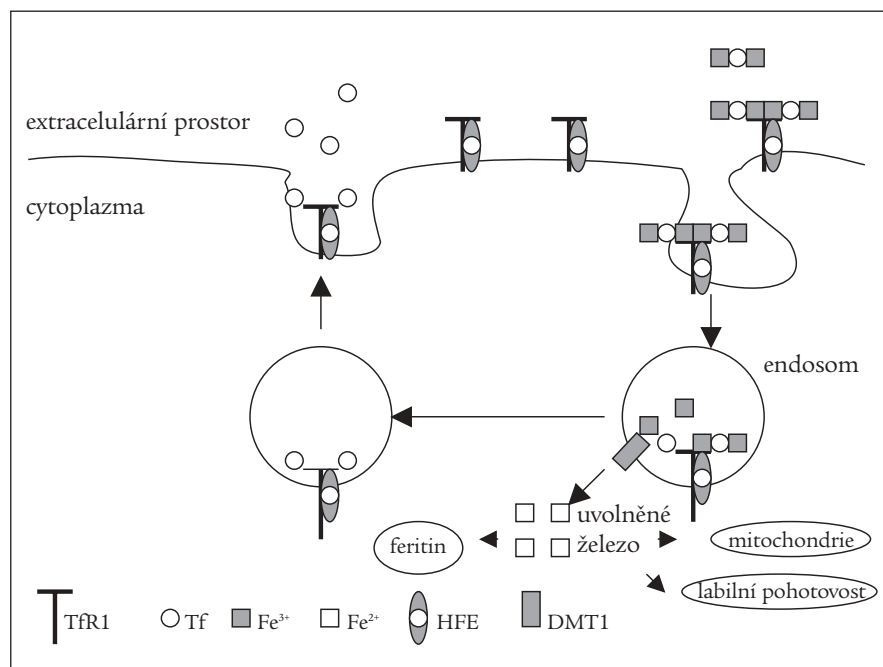


Schéma 4. Transferinový cyklus.

DMT1 – přenašeč dvojmocného železa; TfR1 – transferinový receptor 1; Tf – transferrin

znám, ale asi probíhá za pomoci F/I/M a ceruloplazminu.

Zvláštním typem buněk v resorpci celulárního železa jsou hepatocyty, které nejen že za pomoci TfR-1 a TfR-2 získávají železo, ale stejnou cestou ho v případě potřeby i vylučují.

Pohyb železa v buňce

Dvojmocné železo uvolněné z komplexu Tf-TfR1 \pm HFE a přenesené přes membránu endosomu (schéma 4) se dostává volně do cytoplazmy, v níž tvoří labilní pohotovost. Dále je využito pro potřeby buňky nebo je uskladněno ve formě feritinu. Apotransferrin spolu s transferinovým receptorem se vrátí zpět na povrch buňky a je uvolněn z vazby.

Naše vědomosti o přesném mechanismu přenosu železa přes endosomální membránu jsou zatím malé. Uvažuje se, že Fe^{3+} je nejdříve redukováno na Fe^{2+} a dále je přeneseno transmembránovým přenašečem DMT1. Po přestupu se železo dostává do labilní pohotovosti, ze které je transportováno do mitochondrií pro syntézu hemu, hemoproteinů a enzymů

vyžadujících molekuly železa nebo ukládáno ve formě feritinu. Předpokládá se, že labilní pohotovost je komplex citrátu, cukru, několika aminokyselin, pyridoxalu a nukleotidu, ale jeho skutečná chemická struktura dosud zůstává neznámá [16]. U erytoblastů téměř všechno uvolněné železo z endosomu přestupuje vnější a vnitřní membránu mitochondrie, aby dosáhlo ferochelátázy, která zabuduje molekulu Fe^{2+} do hemu. Myslelo se, že přenos železa do mitochondrií je regulován množstvím syntetizovaného hemu, avšak železo přestupuje přes membrány mitochondrie i při inhibované syntéze protoporphyrinu IX [18]. Neukládá se ve formě feritinu v cytoplazmě, ale v prostoru mezi vnější a vnitřní membránou mitochondrie. Chemická struktura ukládaného železa je jiná než feritinu a je dosud neznámá. Při obnovené syntéze hemu dochází k využití nakumulovaného železa v mitochondrii a pouze zabudováním do hemu je vyloučeno z mitochondrie. Vzniklý hem je vylučován z mitochondrie a navázan s globinem

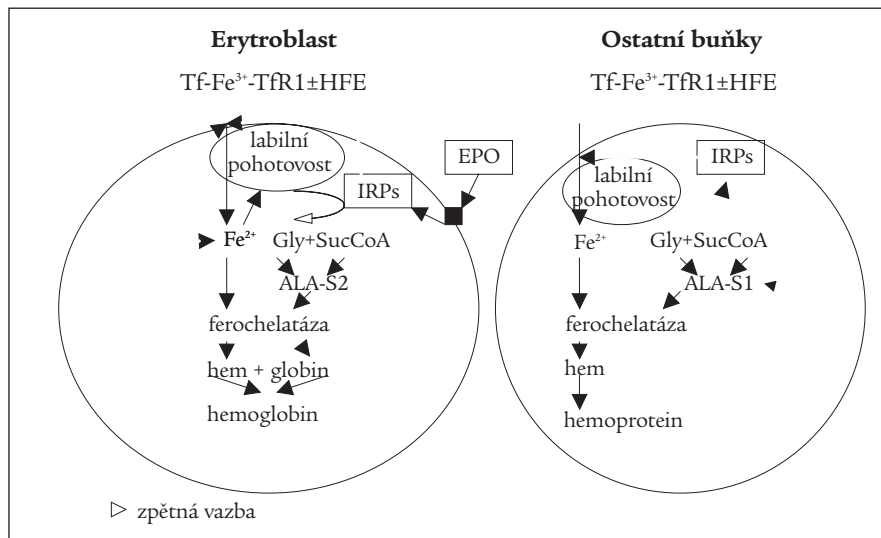


Schéma 5. Regulace resorpce železa buňkou.

ALA-S1 – δ -aminolevulátsyntetáza 1; ALA-S2 – δ -aminolevulátsyntetáza 2, IRPs – regulační proteiny; Gly – glycin; SucCoA – sukcylnyl koenzym A; Tf-Fe³⁺-TfR1±HFE – komplex transferinu, trojmocného železa, transferinového receptoru a HFE

za vzniku hemoglobinu. Minimální množství železa, které nepřešlo přes membránu mitochondrií, se zabudovává do plazmatického feritinu.

Naopak u ostatních buněk je nadbytečné železo ukládáno ve formě feritinu a mitochondrie těchto buněk nedokáží oproti erytroblastům akumulovat železo.

Biosyntéza hemu

Všechny živočišné buňky dokáží syntetizovat hem, kromě erytrocytů a některých buněk na konci jejich diferenciace. Začátkem 50. let minulého století David Shemina a Albert Neuberger objasnili základní aspekty biosyntézy hemu a dokázali, že glycin a sukcylnyl-CoA jsou na začátku tohoto pochodu. V 70. letech 20. století byla poprvé demonstrována regulace syntézy hemu na bakterii *Rhodobacter spheroides* a bylo dokázáno, že syntéza hemu je regulována zpětnou vazbou samotného hemu a je identická ve všech savčích buňkách. Ve srovnání s ostatními buňkami organismu, nejvyšší stupeň biosyntézy hemu probíhá v erytroblastech a hepatocytech, v nichž je třeba velkého množství hemu pro syntézu hemoglobinu

a cytochromů. Dokonce i mezi erytroblasty a hepatocyty je výrazný rozdíl, protože až 85 % biosyntézy hemu probíhá v erytroblastech. Z celkového množství železa v organismu hemoglobin obsahuje asi 70 %, proto pozorujeme rozdílnou regulaci metabolismu železa v erytroblastech a ostatních buňkách organismu.

Pro zvýšené nároky železa a hemu se u erytroblastů vyvinul jiný regulační proces než u ostatních buněk organismu. První krok syntézy hemu se odehrává v mitochondriích a zahrnuje sloučení sukcylnyl-CoA s glycinem za tvorby δ -aminolevulové kyseliny katalyzované enzymem ALA-S2 u erytroblastů a ALA-S1 u ostatních buněk. Syntéza, pravděpodobně i aktivita ALA-S1, je regulována negativní zpětnou vazbou prostřednictvím syntetizovaného hemu (schéma 5).

Na druhé straně u erytroblastů není ALA-S2 inhibována syntetizovaným hemem, ale celulárním železem získaným z Tf. Hem inhibuje resorpci a uvolňování železa z Tf a prostřednictvím koncentrace železa v labilní pohotovosti potom reguluje syntézu ALA-S2, která obsahuje na 5'-konci

mRNA IRE oproti ALA-S1. U ostatních buněk není resorpce regulována množstvím hemu, ale IRE/IRPs komplexem, který kontroluje syntézu TfR1 prostřednictvím množství železa v labilním poolu. Hem reguluje i translaci globinu, která je při nedostatku hemu potlačena.

Aby byla udržena dostatečná syntéza hemu u erytroblastů, je třeba zabezpečit buňkou zvýšené množství železa, na kterém se podílí i eEpo. Zvyšuje aktivitu IRP-1, stabilizuje mRNA TfR1 a jeho zvýšenou syntézou zabezpečuje dostatek železa pro erythropoézu. Naopak aktivovaný IRP-1 se váže s vysokou afinitou k 5'-konci mRNA pro H a L řetězec feritinu a ALA-S2 a potlačuje translaci.

Závěr

Pohyb železa v organismu je přesně regulovaný proces, který zajišťuje homeostázu železa a zabraňuje jeho toxicitě. Poslední roky přinesly řadu důležitých objevů, které pomohly objasnit většinu pochodů, avšak řada procesů zatím zůstala neobjasněna. Snad zatím nejméně probádanou oblastí je resorpce a pohyb hemu v organismu, který se významně podílí na celkovém metabolismu železa v organismu. I řada regulačních procesů, které jsou nezbytnou součástí metabolismu, není dosud úplně objasněna nebo existují zatím v teoretické rovině. Na druhé straně si můžeme na základě současných poznatků vysvětlit mnoho poruch metabolismu železa, lépe je diagnostikovat a v poslední řadě i volit efektivnější terapii.

Literatura

1. Bettany AJE, Eisenstein RS, Munro HN. Mutagenesis of the IRE-BP further defines a role for RNA secondary structure in the regulation of ferritin and TfR expression. *J Biol Chem* 1992; 267: 16531–16537.
2. Müllner EW, Neupert B, Khn LC. Aspecific mRNA binding factor regulates the iron dependent stability of cy-

- toplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell* 1989; 58: 373–381.
3. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I et al. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 2003; 101: 4148–4154.
 4. Roy CN, Enns CA. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* 2000; 96: 4020–4027.
 5. Riedel HD, Muckenthaler MU, Gehrke SG et al. HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood* 1999; 94: 149–152.
 6. Gruenheid S, Cellier M, Vidal S et al. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 1995; 25: 514–525.
 7. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UB. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-iron transporter. *Nature* 1997; 388: 482–488.
 8. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999; 21: 195–199.
 9. Gavin MW, McCarthy DM, Garry PJ. Evidence that iron stores regulate iron absorption – a setpoint theory. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 1376–1380.
 10. Krause A, Neitz S, Margert HJ et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480: 147–150.
 11. Park CH, Valore EV, Waring AJ et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 7806–7810.
 12. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I et al. Lack of hepcidin gene severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8780–8785.
 13. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 1994; 84: 1697–1702.
 14. McKie AT, Marciani P, Rolfs A et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5: 299–309.
 15. Pietrangelo A. Physiology of iron transport and hemochromatosis gene. *Am J Physiol* 2002; 282: 403–414.
 16. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1: 1331–1338.
 17. Bali PK, Zak O, Aisen P. A new form of transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry* 1999; 30: 324–330.
 18. Garrick LM, Gniecko K, Liu Y et al. Iron distribution in rat reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. *Blood* 1993; 81: 3414–3419.
 19. Weiss G, Houston T, Kastner S et al. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: Activation of iron regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cell. *Blood* 1997; 89: 680–687.
 20. Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R et al. Diagnosis of hereditary haemochromatosis using non-invasive methods. *Transfus Med Hemother* 2003; 30: 27–36.
 21. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002; 100: 3776–3781.

MUDr. Miroslav Šimek
www.fnnitra.sk
 e-mail: simek@fnnitra.sk

Doručeno do redakce: 7. 3. 2004
 Přijato po recenzi: 20. 5. 2004