

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA
V NITRE**

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**MECHANIZMY PÔSOBENIA ŽELEZA
V NEURODEGENERATÍVNYCH PROCESOCH
BUNIEK**

BAKALÁRSKA PRÁCA

2012

Dáša Hrtánková

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V
NITRE**

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**MECHANIZMY PÔSOBENIA ŽELEZA
V NEURODEGENERATÍVNYCH PROCESOCH
BUNIEK**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Študijný program: učiteľstvo biológie a chémie

Študijný odbor: učiteľstvo akademických predmetov

Školiace pracovisko: KCH - Katedra chémie

Školiteľ: Doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

Nitra 2012

Dáša Hrtánková

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Dáša Hrtánková

Študijný program: učiteľstvo biológie a chémie

Študijný odbor: učiteľstvo akademických predmetov

Typ záverečnej práce: Bakalárska práca

Jazyk práce: slovenský

Meno, priezvisko a tituly školiteľa: Doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

Meno, priezvisko a tituly konzultanta: prof. Ing. Marián Valko, DrSc.

Názov: Mechanizmy pôsobenia železa v neurodegeneratívnych procesoch buniek

Anotácia:

Práca je zameraná na vysvetlenie katalytického pôsobenia železa vedúceho k tvorbe voľných radikálov v bunkách nervového systému. Súčasťou práce je popis mechanizmov tvorby voľných kyslíkatých radikálov a radikálov odvodených od dusíka a zhodnotenie miery poškodenia biologických molekúl. Práca má kompilačný charakter a sumarizuje najnovšie dostupné poznatky v danej oblasti.

Školiace pracovisko: KCH – Katedra chémie

Vedúci školiaceho pracoviska: Doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

Dátum schválenia: 25. 10. 2010

Doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

podpis

Školiteľ: Doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD.

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že bakalársku prácu na tému Mechanizmy pôsobenia železa v neurodegeneratívnych procesoch buniek som vypracovala samostatne pod odborným vedením školiteľa bakalárskej práce a pri jej tvorbe som použila literatúru, ktorú uvádzam v zozname literatúry.

V Nitre, 19.04.2012

.....

podpis

Pod'akovanie

Vyslovujem poďakovanie vedúcej bakalárskej práce Doc. RNDr. Klaudii Jomovej, PhD. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri koncipovaní tejto práce.

V Nitre, 19.04.2012

.....

podpis

ABSTRAKT

HRTÁNKOVÁ, Dáša: Mechanizmy pôsobenia železa v neurodegeneratívnych procesoch buniek. [Bakalárska práca]. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. Fakulta prírodných vied. Školiteľ: doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD. Bakalár učiteľských predmetov biológia - chémia. Nitra : FPV, 2010. 52 s.

Práca je zameraná na spracovanie prehľadu poznatkov o metabolizme železa, ktorý je jednou z najdôležitejších súčastí fungovania ľudského organizmu. Ide o zložitý proces s mnohými riadiacimi dráhami, ktoré citlivo a efektívne regulujú príjem železa na základe aktuálnych potrieb organizmu. Počas života sa každý organizmus vyvíja, a tak sa menia i jeho požiadavky na množstvo železa. Molekulárno-genetické mechanizmy sú dokonale koordinované a akákoľvek porucha jednotlivých zložiek, či už vplyvom ochorenia alebo prostredia, vedie k narušeniu rovnováhy železa v organizme. Bolo dokázané, že železo (spolu s meďou) je zahrnuté v poškodení nervových buniek pri mnohých neurodegeneratívnych ochoreniach, hlavne Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba. U pacientov s neurodegeneratívnymi ochoreniami bola dokázaná kumulácia kovov (Fe, Cu) v nervových bunkách, čo potvrdzuje ich úlohu pri daných ochoreniach. Za určitých podmienok sú tieto kovy najsilnejšie pro-oxidanty participujúce v produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS, Reactive Oxygen Species), ktoré spôsobujú oxidačné poškodenie biomolekúl (proteínov, DNA a lipidov), čo vedie k štrukturálnym a funkčným zmenám.

Kľúčové slová: Metabolizmus železa. Absorbcia. Voľné radikály. Oxidačný stres. Neurodegeneratívne ochorenia.

ABSTRACT

HRTÁNKOVÁ, Dáša: Mechanisms of iron functioning in neurodegenerative cell processes. [Bachelor Thesis]. Constantine the Philosopher University in Nitra. Faculty of Natural Sciences. Supervisor: doc. RNDr. Klaudia Jomová, PhD. Bachelordegree program Teaching, Department of Biology - Chemistry. Nitra : FNS, 2010. 52 s.

This thesis is focused on a review of knowledge about the metabolism of iron, which is a key element in the functioning of the human body. It is a complex process with many control pathways that sensitively and effectively regulate intake of iron based on actual body needs. During the life every organism develops and so the requirements for the amount of iron change too. Molecular-genetic mechanisms are perfectly coordinated and any failure of the individual elements either due to disease or environment leads to disruption of the iron balance in organism. It has been evidenced that iron (together with copper) is involved in neuronal damage in many neurodegenerative disorders mainly Alzheimer disease, Parkinson disease, as well as Huntington disease. It has been observed that patients with neurodegenerative diseases accumulate metals (Fe, Cu) in their nervous system confirming the role of these metals in the respective diseases. Under certain conditions, metals are the most potent pro-oxidant participating in production of the Reactive Oxygen Species that cause oxidative damage to proteins, DNA and lipids leading to structural and functional alternations.

Keywords: Iron metabolism. Absorption. Free radicals. Oxidative stress. Neurodegenerative diseases.

Obsah

Zoznam ilustrácií	9
Zoznam tabuliek	9
Zoznam skratiek	10
Úvod.....	11
1 Ciele práce	12
2 Biologický význam a fyziologické funkcie železa v organizme.....	13
3 Homeostáza železa v živom organizme	17
3.1 Absorbcia železa	17
3.1.1 Nehemové (iónové železo).....	21
3.1.2 Hemové železo	22
3.2 Transport a bunkový príjem.....	25
3.3 Zásoba železa	28
4 Regulačné mechanizmy hladiny železa.....	30
4.1 Postranskripčné mechanizmy regulácie bunkového metabolizmu železa.....	30
4.2 Hepcidín	33
4.2.1 Význam hepcidínu.....	33
4.2.2 Mechanizmus pôsobenia hepcidínu cez feroportín	34
4.2.3 Hepcidín a hemochromatóza	35
5 Voľné radikály.....	38
5.1 Fyziologická tvorba voľných radikálov	39
5.2 Oxidačný stres.....	40
5.3 Účasť železa na produkcii voľných radikálov	40
6 Antioxidanty	42
7 Neurodegeneratívne ochorenia.....	44
7.1 Alzheimerova choroba	44
7.2 Parkinsonova choroba	46
Záver	48
Zoznam použitej literatúry	49

Zoznam ilustrácií

Obrázok 1 Hemoglobín.....	18
Obrázok 2 Molekula hemu.	18
Obrázok 3 Myoglobín.....	18
Obrázok 4 Schéma rozpadu erytrocytov a odbúravania hemoglobínu.	20
Obrázok 5 Feritín.....	24
Obrázok 6 Hemosiderín.	24
Obrázok 7 Štruktúra molekuly transferínu..	24
Obrázok 8 Cesty hemového a nehemového železa v organizme.....	25
Obrázok 9 Transferínový cyklus.....	27
Obrázok 10 Prehľad metabolizmu železa v organizme.	29
Obrázok 11 Feredoxín.	33
Obrázok 12 Regulácia homeostázy železa hepcidínom.....	36

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Prehľad niektorých plazmatických bielkovín a ich vlastností.....	14
Tabuľka 2 Distribúcia železa v organizme	16
Tabuľka 3 Prehľad chromozómov a ich génov.....	45

Zoznam skratiek

AD	Alzheimer Disease (Alzheimerova choroba)
ApoE	Apolipoprotein E (apolipoproteín E)
APP	Amyloid Precursor Protein (prekurzorový proteín amyloid)
Cu, Zn – SOD	Copper, Zinc - Superoxide Dismutase (meď, zinok – superoxidáza)
Dcytb	Duodenal cytochrom b (duodenálny cytochróm b)
DMT1	Divalent Metal Transporter 1 (transportér divalentných kovov 1)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
Dps	DNA-binding proteins from starved cells (mini – feritín)
Fe	Ferum (železo)
GSH	Glutathione (glutation)
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide (antimikrobiálny hepcidínový peptid)
Hb	Hemoglobin (hemoglobín)
HCP1, 2	Heme Carrier Protein 1, 2 (enterocytový hemový transportér 1, 2)
HFE	Human Hemochromatosis Protein (gén pre hemochromatózu)
HH	Hereditary Hemochromatosis (hereditárna hemochromatóza)
HJV	Hemojuvelin (hemojuvelín)
HD	Huntington Disease (huntingtonova choroba)
HO - 1	Heme Oxygenase - 1 (hemová oxygenáza - 1)
IRE	Iron – Responsive Elements (železo viažuce elementy)
IRP	Iron Regulatory Proteins (železo regulujúce proteíny)
Mn - SOD	Manganese Superoxide Dismutase (mangán – superoxidáza)
MTP1	Metal Transport Protein 1 (feroportín)
NTBI	Nontransferin Bound Iron (netransferínovo viazané železo)
PD	Parkinson Disease (parkinsonova choroba)
PSEN1, 2	Presenilin1, 2 (presenilín1, 2)
ROS	Reactive oxygen species (reaktívne formy kyslíka)
SDAT	Senile Dementia of the Alzheimer Type (senilná demencia alzheimerovho typu)
SN	Substantia Nigra (substantia nigra)
Tf	Transferrin (transferín)
TrfR1, 2	Transferrin Receptor 1, 2 (transferínový receptor -1, 2)
USF2	Upstream Stimulatory Factor 2 (transkripčný faktor myši)

Úvod

Železo je esenciálny prvok a takmer všetky bunky v organizme využívajú tento prvok ako kofaktor pre fundamentálne biochemické aktivity, akými sú napríklad transport kyslíka, energetický metabolizmus bunky a syntéza DNA. Železo sa v bunkách vyskytuje najčastejšie v dvoch oxidačných stupňoch ako Fe(II) a Fe(III). Veľmi široké využitie železa v biochemických procesoch je vďaka flexibilnej koordinačnej chémii a redoxnej reaktivite železa, ktorá umožňuje jeho väzbu s proteínmi, väzbu s kyslíkom, prenos elektrónov alebo katalytické pôsobenie v reakciách.

Napriek významnému postaveniu železa v metabolizme buniek, tento prvok je aj potenciálne toxický, nakoľko pri aeróbných podmienkach katalyzuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS, reactive oxygen species) a tvorbu vysoko reaktívnych radikálov (napríklad hydroxylový radikál) cez Fentonovu reakciu.

Porušenie bunkovej redoxnej rovnováhy vyžaduje len katalytické množstvo tohto kovu. Oxidačný stres je asociovaný s poškodením biomolekúl, hlavne proteínov, nukleových kyselín a lipidov, čo vedie k poškodeniu lipidových membrán, tkanív a vzniku rôznych ochorení. V poslednom období je veľká pozornosť venovaná hlavne účasti železa (spolu s meďou) na vzniku neurodegeneratívnych chorôb, hlavne Alzheimerovej, Parkinsonovej a Huntingtonovej choroby. Tieto ochorenia sú celosvetovo rozšírené a predstavujú závažné poškodenie nervových buniek.

S ohľadom na veľký biologický význam na jednej strane a potenciálnej toxicite na strane druhej, musí byť príjem železa do buniek a jeho celkový obsah v organizme precízne riadený. A tak si organizmus vyvinul prísne regulovaný mechanizmus príjmu, transportu a skladovania železa, na ktorom sa podieľajú mnohé vysoko špecializované proteíny. Ich úloha a význam boli odhalené na základe *in vitro* experimentov. Medzi najvýznamnejšie objavy za posledné obdobie patrí objasnenie úlohy hepcidínu ako humorálneho faktora kontrolujúceho homeostázu železa.

V našej práci sa zameriavame na proteíny, ktoré udržiavajú homeostázu železa v živých organizmoch, na mechanizmus vzniku radikálov za účasti železa (tvorba ROS), úlohu antioxidantnej obrany, ako aj princípy vzniku neurodegeneratívnych ochorení.

1 Ciele práce

Cieľom práce je spracovanie prehľadu výsledkov vedeckých štúdií z domácich a zahraničných literárnych zdrojov týkajúcich sa úlohy transportných, zásobných a regulačných proteínov pri udržiavaní homeostázy železa v živých organizmoch a dôsledky jej porušenia. V práci je diskutovaný mechanizmus účasti železa na oxidačnom poškodení biomolekúl a súvislosť s neurodegeneratívnymi ochoreniami.

Konkrétne spracované oblasti:

1. Kľúčové proteíny bunkovej homeostázy železa, absorpcie, transportu a uskladnenia železa v živých organizmoch.
2. Regulačné mechanizmy homeostázy železa – IRP (iron regulatory proteins), hepcidín.
3. Železom indukovaný oxidačný stres.
4. Antioxidačné enzýmy.
5. Železo v neurodegeneratívnych ochoreniach

2 Biologický význam a fyziologické funkcie železa v organizme

Minerály, ktoré sa síce vyskytujú v malých množstvách, ale zastávajú významné funkcie, sa nazývajú mikrominerály alebo stopové prvky. Medzi ne patrí 15 prvkov: železo, zinok, meď, mangán, chróm, jód, selén, fluór, kremík, germánium, kobalt, molybdén, vanád, bór a nikel (Zachar, D., 2004). Železo je nevyhnutným prvkom s významnou úlohou v živých organizmoch. Známe je predovšetkým pre svoju účasť v biologických systémoch ako kofaktor potrebný pre bunkové enzymatické reakcie podporujúce normálnu fyziológiu a slúži ako väzbové miesto pre molekulový kyslík v hemoglobíne. Toxikologický záujem o železo pochádza z jeho účasti na oxido – redukčných reakciách, reakciách s molekulovým kyslíkom a účasti na tvorbe ROS (reaktívnych foriem kyslíka). ROS majú silný oxidačný potenciál a mechanizmus vzniku vyjadruje Haber-Weissova reakcia. Fentonova chémia tvorby hydroxylového radikálu ($\cdot\text{OH}$) za účasti železa poskytuje všeobecne prijímaný chemický základ na vysvetlenie špúšťania biochemických zmien spojených s toxicitou železa. Veľmi dobre sú zdokumentované patologické stavy (vrátne a nevrátne) súvisiace s nadbytkom železa v tkanivách pri ľudských ochoreniach známych ako hemochromatóza. Patologické ukladanie železa v cieľových orgánoch rieši toxikológia a je to problém verejného zdravia, hoci na druhej strane je vo svete väčší problém – deficiencia železa. Stav kolízií hladiny železa v organizme sa môžu objaviť u ľudí ako dôsledok rozličných porúch metabolizmu (Beutler et al., 2003). V súvislosti s poruchami metabolizmu železa je v posledných 2 – 3 desaťročiach pozornosť venovaná nasledovným trom oblastiam:

- bunkové a molekulárne mechanizmy v regulácii vstrebávania železa, jeho transport a uskladnenia, nazývané metabolizmus železa,
- patofyziologické mechanizmy chronickej toxicity preťaženia železom,
- ľudská molekulárna genetická báza, diagnostika a klinické riadenie chorôb z nadbytku železa.

Železo je nevyhnutné nielen pre život vyšších organizmov, ale je aj základnou existenčnou podmienkou pre mikroorganizmy. V prípade patogénnych mikroorganizmov má regulácia prítomnosti voľného železa v plazme kľúčovú úlohu pri prekonávaní infekcie. Organizmus disponuje proti bakteriálnym patogénom mnohými obrannými mechanizmami. Jedným z najdôležitejších mechanizmov obrany je

mechanizmus tzv. „uzamknutia železa.“ Ľudské telo má zložitý mechanizmus na dlhodobú kontrolu voľného železa v sére, ktorý však počas infekcie krátkodobo znižuje koncentráciu tohto prvku, čím zabraňuje rozmnožovaniu patogénov. Medzi dané mechanizmy zaradujeme (tab. 1):

- väzbu na transferín – prenášač železa,
- väzbu na feritín – proteín uskladňujúci železo v tkanivách a sére,
- väzbu na laktoferín – proteín prítomný vo výlučkoch slizníc,
- zníženie vstrebávania z tenkého čreva počas infekcie až o 80%,
- uvoľnenie neutrofilov s produkciou apolaktoferínu v ložisku infekcie,
- syntéza oxidu dusného makrofágmi kvôli narušeniu bakteriálneho metabolizmu železa,
- uvoľnenie hemopexínu a haptoglobínu z pečene.

Tabuľka 1 Prehľad niektorých plazmatických bielkovín a ich vlastností (Trojan et al., 2003)

Bielkovina	Priemerná koncentrácia (g/l)	Molekulová hmotnosť	Funkcie
Albumín	42	69 000	transport mastných kyselín, bilirubínu, sekundárny nosič pre hem, tyrozín, kortizol, zásobný proteín
Feritín	$6,1 \cdot 10^{-5}$	450 000	uskladňuje železo v tkanivách a sére
Haptoglobín (α_2 -globulín)	0,4 - 1,8	85 000	viaže hemoglobín uvoľnený pri intravaskulárnom rozpade erytrocytov
Hemopexín (β_1 -globulín)	0,7	57 000	viaže hem z hemoglobínu
Transferín (β_1 -globulín)	2,9	77 000	transport Fe
Transkobalamín	$94 \cdot 10^{-8}$	60 000	transport vitamínu B ₁₂
Proteín viažuci kovy (α_1 -globulín)	0,055	308 000	transport Ba, Sr, Ni

Napriek všetkým týmto mechanizmom sú mikroorganizmy schopné získavať železo od hostiteľa už pri nízkych koncentráciách alebo z viazaných ťažko dostupných foriem. Železo získavajú viacerými spôsobmi z:

- voľných iónov krvnej plazmy,
- voľných iónov zvnútra buniek (chlamýdie, protozoa),
- rozkladu červených krviniek (hemolýza, hemolytické streptokoky),
- rozkladu hemoglobínu a asimiláciou hemu,
- extrakcie viazaného železa z feritínu prostredníctvom siderofórov na povrchu baktérií.

Chemické funkcie železa:

- prechodný kov pre bunkovú a tkanivovú životaschopnosť organizmov,
- prenos kyslíka – hemoglobínom v krvi, myoglobínom v tkanivách,
- tvorba akumulčných komplexov v pečeni a pankrease,
- redoxný katalyzátor v rôznych reakciách,
- zložka enzýmov (kataláza, peroxidáza, cytochróm),
- detoxikácia voľných kyslíkových radikálov.

Biologické funkcie železa:

- podpora normálneho vývoja plodu a detí,
- kladný vplyv na kožu a vlasy,
- predchádza chudokrvnosti,
- podieľa sa na tvorbe energie,
- podporuje duševnú činnosť, znižuje únavu a chráni pred duševnými chorobami,
- zabezpečuje normálnu činnosť organizmu, najmä mozgu, svalov, štítnej žľazy a orgánov imunitného systému.

Zlúčeniny s obsahom železa v organizme (tab. 2):

- hemoproteíny: hemoglobín, myoglobín, cytochrómy, enzýmy,
- transferín (β – globulín plazmy),

- laktoferín, laktotransferín v exogénnych sekrétoch bunky (mlieko, slzy, pankreatická šťava) a endogénnych sekrétoch bunky (leukocyty),
- feritín (zásobný proteín železa v bunkách),
- hemosiderín (nerozpustná forma intracelulárneho železa),
- enzýmy obsahujúce železo: kataláza, peroxidáza, ribonukleidreduktáza, jantárova dehydrogenáza, cytochrómoxidáza a iné,
- chelátové komplexy železa: s citrátmi, nukleotidmi, aminokyselinami, sacharidmi a inými.

Tabuľka 2 Distribúcia železa v organizme (Hrtánková, 2012)

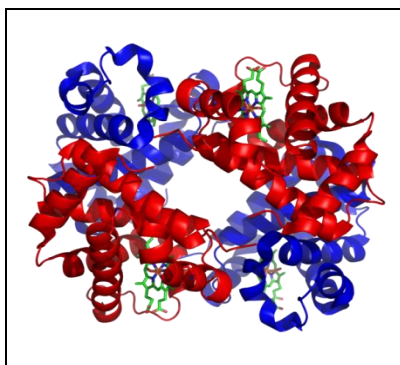
Prenášače železa	Množstvo v mg
Hemoglobin	2100
Myoglobin	300
Feritín, hemosiderín	1000
Transferín	3
Retikuloendotelový systém	600

3 Homeostáza železa v živom organizme

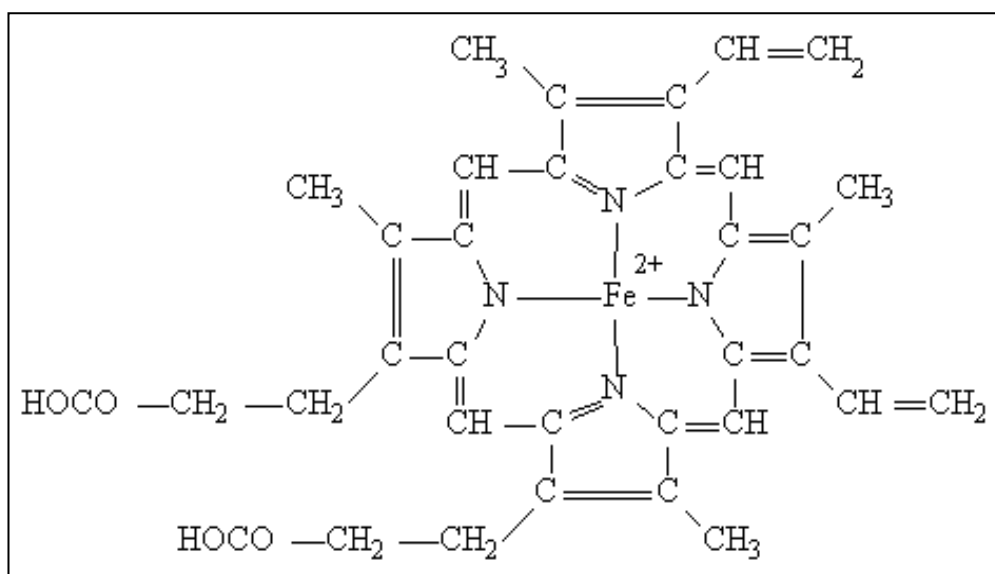
Homeostáza železa je metabolizmus železa, ktorý v organizme predstavuje uzavretý systém, kde je väčšina železa reutilizovaná a menšie straty sú dopĺňované z vonkajších zdrojov (Trojan et al., 2003).

3.1 Absorbpcia železa

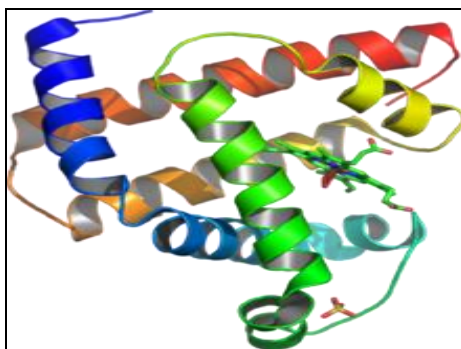
Neprítomnosť kontrolného regulačného mechanizmu pre vylučovanie železa z tela poukazuje na zásadný význam úlohy vstrebávania železa zo stravy v regulácii homeostázy železa v organizme. Medián príjmu železa bol Národnou akadémiou potravín a radou pre výživu stanovený približne na 16 – 18 mg /osobu/ deň pre mužov a 12 mg /osobu/ deň u žien. (Institute of Medicine and Food and Nutrition Board, 2001). Analýza príjmu živín amerického ministerstva (USDA) pre poľnohospodárstvo 1994 – 1996 odhaduje priemerný príjem železa na asi 17,7 mg /osobu/ deň pre dospelých mužov a 12,7 mg /osobu/ deň pre dospelé ženy (USDA, 2000). Tolerancia hladiny príjmu železa u dospelých bola určená na 45 mg/deň a to na základe gastrointestinálnych nežiadúcich účinkov. Je dokázané, že vstrebávanie železa z potravy sa odohráva v dvanástniku a z vyššie uvedených odhadov príjmu železa sa vstrebáva len 1 až 2 mg na dospelú osobu za deň pri normálnych fyziologických podmienkach (Institute of Medicine and Food and Nutrition Board, 2001). Toto množstvo absorbovaného železa z potravy je dostatočné na kompenzáciu približne 1 až 2 mg neregulovanej straty železa potom, obmenou pokožky, a rovnaké množstvo vylúčené močom a sekréciou žlče. Väčšinu z celkového množstva železa u človeka pohlcujú erytroidné bunky pre syntézu hemu (obr. 2) v hemoglobíne (obr. 1), ktorá využíva približne 20 mg železa denne (Andrews, 1999; Brissot, Deugnier 1999). Ide o recykláciu železa zo starnúcich červených krviniek, ktoré sú poškodené alebo na konci svojej normálnej životnosti (120 dní) (obr. 4, 10), slúžiacu ako rozhodujúci mechanizmus pre doplnenie tohto poolu železa.



Obrázok 1 Hemoglobín. Skladá sa z proteínovej zložky-globínu (modré a červené reťazce) a porfyrínového kruhu - hemu (zelené reťazce) (Houda, 2011).



Obrázok 2 Molekula hemu vytvárajúca porfyrínový kruh s uprostred naviazaným dvojmocným železom (Houda, 2011).



Obrázok 3 Myoglobín. Tvorený je jednoreťazcovou proteínovou zložkou - globínom, na ktorú je naviazana molekula hemu s jedným atómom Fe^{2+} (Kunert, 1999).

Makrofágy v slezine a retikuloendotelovom systéme sú bunkovými aktérmi procesu recyklácie, v priebehu ktorého sa uvoľní železo do plazmy na ďalšie spracovanie v metabolizme železa.

V črevnom dvanástniku je absorbované železo z potravy prítomné v dvoch formách a to vo forme hemového (protoporfín alebo organické) a nehemového železa (iónové) (obr. 8). Nehemové železo je najviac zastúpená forma v ľudskej strave (Anderson et al., 2005; Brissot et al., 2004). Hemové železo predstavuje iba 10% až 15% nájdeného železa, zatiaľ čo zastúpenie prevládajúcej formy nehemového železa, sa odhaduje na približne 85% až 90% zo všetkého železa v normálnej ľudskej strave (Brissot et al., 2004; Carpenter, Mahoney, 1992). Rozdiely medzi typmi zemepisných oblastí a životným štýlom v stravovaní sa (Stredomorie, západné oblasti atď), môže mať vplyv na výskyt jednotlivých foriem železa zastúpených v ľudskej strave (Andrews, 2005; Monsen, 1988). Napriek tomuto významnému rozdielu v biologickej dostupnosti sú mechanizmy pre vstrebávanie nehemového železa všeobecne lepšie preskúmané ako mechanizmy hemového železa. Mechanizmy absorpcie oboch foriem železa z potravy sú dôležité pre pochopenie fyziologických procesov.

Na základe vedeckých dôkazov o metabolizme železa u človeka a zvierat je všeobecný predpoklad, že keď hladina železa uloženého v tele je nízka, rýchlosť vstrebávania železa sa zvyšuje, a naopak, keď je hladina železa uloženého v tele vysoká, rýchlosť vstrebávania železa je znížená (Institute of Medicine and Food and Nutrition Board, 2001).

Pohyb železa v potrave začínajúci z miesta absorpcie a vedúci až k uskladneniu v proteínoch je dôkladne preštudovaný na molekulovej úrovni. Vstrebávanie železa z potravy ovplyvňuje prítomná forma železa, stav jeho zásob v organizme a tiež niektoré ochorenia ako je systémový zápal, hypoxia, dysfunkčná erythropoetická činnosť, alkoholické poškodenie pečene a hepatocelulárny karcinóm. Mnohé z týchto faktorov navzájom súvisia alebo sa môžu vyskytovať súčasne, čo vedie k zvyšovaniu zložitosti procesov črevného vstrebávania železa a mechanizmov homeostázy železa v organizme.

Vplyv známych predispozičných genetických faktorov modifikujúcich expresiu niektorých makromolekulových účastníkov vstrebávania železa z potravy môže komplikovať tento systém a vytvárať pôdu pre genetické choroby zahŕňajúce mechanizmy týkajúce sa metabolizmu železa. Známe genetické aspekty regulácie vstrebávania železa z potravy a molekulárna genetika ľudských chorôb z nadbytku železa boli podrobne skúmané (Andrews, 2000; Beutler, 2006; Brissot et al., 2004;

Camaschella, 2005; Le Gac, Ferec, 2005), a autori poukázali na vplyv mutácií na homeostázu železa (Stremmel et al., 2007). Tento dôležitý aspekt metabolizmu železa bol preskúmaný v súvislosti so snahou pochopiť ako nefunkčnosť niektorých molekúl v metabolizme železa môže byť predzvesťou toxicity železa v dôsledku prítomnosti charakteristických genotypov, ktoré sú odlišné. Tieto oblasti sú veľmi dôležité pre pochopenie genetického základu ľudských chorôb z nadbytku železa, pre prevenciu a skrining. Pochopenie klinického významu ochorenia z nadbytku železa umožňuje stanoviť postupy vhodné pre liečbu a zmiernenie poškodenia tkanív spôsobené železom. Experimentálne štúdie s použitím bunkových systémov a zvieracích modelov k štúdiu metabolizmu železa, klinické skúsenosti s nedostatkom a nadbytkom železom uľahčujú pochopenie ciest, základných účastníkov a mechanizmov podieľajúcich sa na absorpcii hemového a nehemového železa.



Obrázok 4 Schéma rozpadu erytrocytov a odbúravania hemoglobínu (Hrtánková, 2012).

3.1.1 Nehemové (iónové železo)

Za normálnych fyziologických a genetických podmienok je prvým krokom pri príjme nehemového železa v potrave biochemická premena prebiehajúca v črevnom lumene železitej oxidovanej formy (Fe^{3+}) na redukovanú železnatú formu (Fe^{2+}). Železité železo ako prírodná zložka potravín sa v strave obyčajne vyskytuje vo väčšom množstve ako železnatá forma a to predovšetkým vzhľadom k svojej chemickej stabilite. K redukcii Fe^{3+} na Fe^{2+} je potrebný membránovo viazaný enzým Dcytb, ktorý sa nachádza v dvanástnikových enterocytoch (obr. 8) (McKie et al., 2002). Existuje množstvo experimentálnych dôkazov o redukcii železitých iónov na železnaté ióny prostredníctvom cirkulujúcej kyseliny askorbovej, citrátu a glutatiónu (Conrad, 1970; Dorey et al., 1993; Han et al., 1995; Thomas, Oates, 2004).

Významným faktorom zvyšujúcim črevnú absorpciu nehemového železa je kyslé prostredie v črevnom lumene. O účinku kyselín je známe, že podporujú rozpúšťanie železa pre črevnú absorpciu, zatiaľ čo iné látky ako sú fosfáty, EDTA a fytáty môžu chelataciou znížiť absorpciu nehemového železa.

Transport Fe^{2+} cez enterocyty apikálnej plazmatickej membrány sprostredkuje dvojmocný prenášač 1 (DMT1 - divalent metal transporter) (tiež známym ako dvojmocný kationový prenášač 1 [DCT1]) (obr. 8) (Fleming et al., 1997; Gunshin et al., 1997). Úloha DMT1 pri prenose Fe^{2+} z potravy bola potvrdená mutáciami DMT1 v genóme myši (Fleming et al., 1997). Tieto zvieratá vykazovali nedostatok železa v dôsledku inhibície príjmu železa z potravy (Canonne-Hergaux et al., 1999; Gunshin et al., 1997). Zaujímavé je, že DMT1 prenáša širokú škálu dvojmocných kovových kationov vrátane Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+} (Gunshin et al., 1997). Pokiaľ ide o jeho expresiu v iných tkanivách, bol DMT1 lokalizovaný u myši v astrocytoch a je zapojený do sprostredkovania príjmu železa v centrálnom nervovom systéme (Jeong, David, 2003). DMT1 je v obličkách potkanov vysoko exprimovaný a citlivý na príjem železa v potrave (Wareing et al., 2003). Sledovaním expresie DMT1 v hepatocytoch potkana ukázalo, že k zvýšeniu dôjde v záťažovom stave a k poklesu po vyčerpaní železa (Trinder et al. 2000). U človeka bola úloha DMT1 ako prenášača železa identifikovaná na základe mutantnej alely DMT1 u pacientov s mikrocytárnou anémiou (Mims et al., 2005; Priwitzerova et al., 2004).

Potom, čo je železo transportované do enterocytov pomocou DMT1, sa buď naviaže na bielkovinu feritín alebo pokračuje k bazolaterálnej membráne enterocytov k transmembránovému proteínovému prenášaču feroportínu (tiež známym ako MTP1 – metal transport protein) (Abboud and Haile, 2000; Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000). Železo uložené intracelulárne vo feritíne, netvorí dlhodobé zásoby, pretože životnosť enterocytov je asi len 2 dni a odlúpené enterocyty sú vylučované vo výkaloch (obr. 11) (Crichton et al., 2002; Fleming, 2005).

Exportu železa cez feroportín napomáha membránový proteín hefestín, ktorý oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} , a tak uľahčuje transport železa (obr. 8) (Chen et al., 2004; Frieden, Osaki, 1974; Vulpe et al., 1999). Anderson et al. (2002) dokázali, že nedostatok hefestínu vedie k ťažkej anémii z nedostatku železa.

Feroportín je intenzívne študovaný pre jeho úlohu ako jediného známeho bunkového prenášača železa (obr. 8) (Ganz, 2005). Cielené narušenie feroportínovej alely (Fpn) malo za následok hromadenie železa v enterocytoch, makrofágoch a hepatocytoch v rannom štádiu embrya myši (Donovan et al., 200; Nicolas et al., 2001; Rivera et al., 2005; Roetto et al., 2003). V poslednej dobe bolo veľmi dôležité preukázanie regulácie feroportínu v pečeni peptidovým hormónom hepcidínom (Ganz, 2006). Regulácia feroportínu hepcidínom funguje tak, že hepcidín sa spája s feroportínom a vyvoláva jeho endocytózu a degradáciu v lyzozómoch (Nemeth et al., 2004). Avšak nedávno bolo zistené, že feroportín funguje inak v enterocytoch ako v makrofágoch (Oates, 2007). Hepcidín je preto teraz považovaný za centrálny regulátor metabolizmu železa (Fleming, Bacon, 2005; Ganz, 2004).

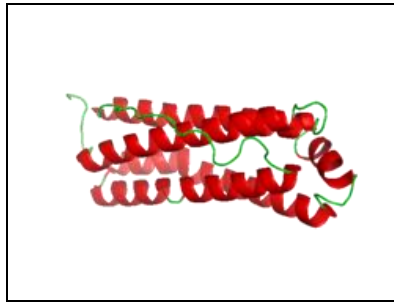
3.1.2 Hemové železo

Črevné vstrebávanie hemového železa z potravy nabralo na význame, vrátane jeho kľúčovej úlohy v hemoglobíne a skupiny protetickej rady enzýmov. Hemové železo má zásadný význam pre základné ľudské fyziologické procesy, najmä pre metabolizmus. Vzhľadom k jeho fyzikálno-chemickým vlastnostiam je veľmi málo rozpustné, ale jeho črevné vstrebávanie je účinné a v skutočnosti má vyššiu biologickú dostupnosť ako nehemové železo (Bezwoda et al., 1983; Hallberg, 1981; Layrisse, Torres, 1972; Turnbulletal, 1962). Bunkový základ pre túto efektívnosť je pravdepodobne kvôli preprave hemového železa do subcelulárnych priestorov pomocou energeticky

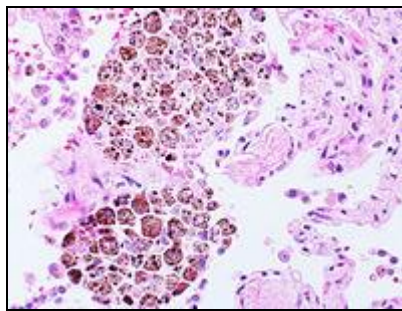
závislých transmembránových hem viažúcich proteínov, z ktorých niektoré boli identifikované v čreve a v periférnych tkanivách (Latunde-Dada et al., 2006). Významný pokrok v nedávnej dobe dosiahli v identifikácii transportného proteínu pre hemové železo nazývaného proteínový nosič hemového železa 1 (HCP1 – hem carrier protein) (Shayeghi et al., 2005). HCP1 je proteín plazmatickej membrány s vysokou expresiou v proximálnej oblasti čreva, čiže v rovnakej lokalite čreva, kde bolo pre hemové železo známe, že sa dobre absorbuje ešte pred objavom HCP1 (Grasbeck et al., 1979, 1982). HCP1 je hlavným transportným proteínom schopným špecificky prenášať hemové železo do buniek (obr. 8). Má vysokú expresiu v čreve a nižšiu úroveň v pečeni a obličkách (Latunde-Dada et al., 2006). Bol naklonovaný a identifikovaný z dvanástnika myši.

Pochopenie funkčnej úlohy a bunkového mechanizmu HCP1 bolo rozhodujúce vo vytváraní poradia krokov pre vstrebávanie hemového železa u cicavcov. V prvom kroku musí byť hemové železo uvoľnené z hemoglobínu a myoglobínu proteínov, čo je proces zabezpečovaný proteolytickými enzýmami pôsobiacimi v lumene žalúdka a tenkého čreva. Vzhľadom k tomu, že "voľne plávajúce" hemové železo je chemicky nestabilné, musia existovať niektoré biochemické mechanizmy pre jeho stabilizáciu, aby bolo možné ľahko dosiahnuť bunkový príjem. Jednou z možností je, že hem je pre svoj transport prechodne naviazaný na aminokyseliny cez proteíny (Latunde-Dada et al., 2006). Ďalšia možnosť je založená na tom, že hem sa vstrebáva na apikálnom povrchu enterocytov tenkého čreva. K uvoľneniu hemu od železa dôjde intracelulárne pomocou enzymatickej katalýzy. Najlepším kandidátom v tejto oblasti je indukovateľný mikrozomálny enzým hemoxygenáza (HO-1), ktorá môže katabolizovať porfyrínový kruh železa za vzniku železa (Fe^{2+}), CO a bilirubínu (Raffin et al., 1974). Dôkazy na podporu tohto názoru zahŕňajú inhibíciu vychytávania hemového železa po liečbe s inhibítormi HO-1 (Boni et al., 1993). Po oddelení protoporfyrínového kruhu hemu od železa pomocou HO-1 sa "voľne plávajúce" železo vstrebáva rovnakou črevnou cestou ako nehemové (iónové) železo z potravy (obr. 8) (Andrews, 2005). Okrem toho pozorovanie, že nehemové (iónové) železo z potravy je schopné potlačiť vstrebávanie hemového železa z potravy, a naopak, pridáva ďalšiu podporu návrhu, že dve formy železa v potrave môžu mať aj spoločné cesty k ich absorpcii (Anderson et al., 2005; Hallberg, Solvell, 1967). Jednou z možných oblastí kardiotoxikologického významu je prevalencia vyššej expozície hemu v populáciách konzumujúcich veľké množstvo mäsa

ako sú západné priemyselné krajiny (Anderson et al. 2005). Takýto koncept môže viesť k toxikologickému začiatku každodenné chronického podávania hemu zo stravy.



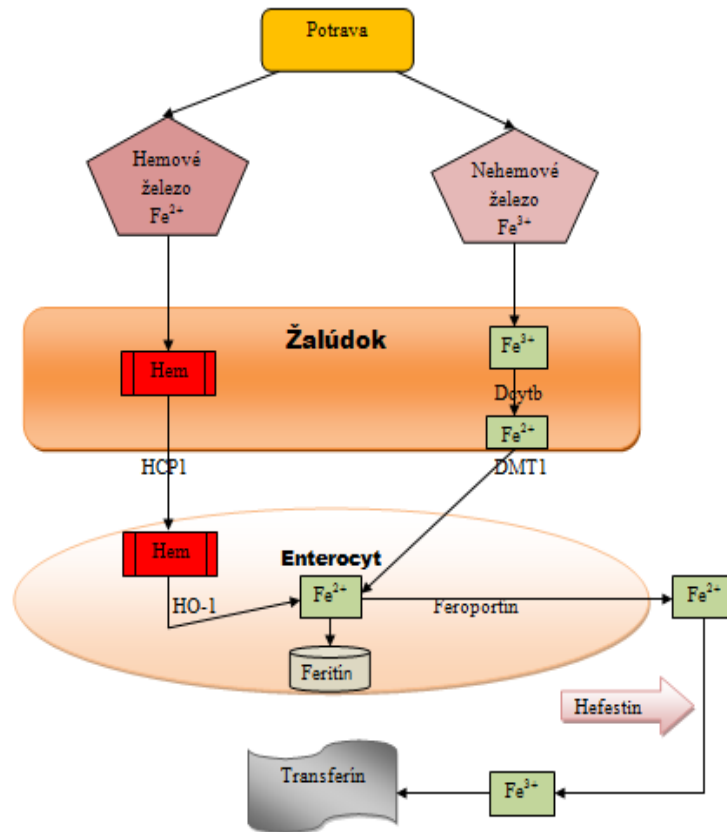
Obrázok 5 Feritín. Jeho obal je tvorený z 24 molekúl zložených z dvoch podjednotiek- H (ťažká) a L (ľahká) (Santambrogio et al. 2004).



Obrázok 6 Hemosiderín je nekompletne degradovanou molekulou feritínu zo železa, feritínových proteínov a ďalších bunkových zložiek (Houda, 2011).



Obrázok 7 Štruktúra molekuly transferínu. Polypeptid zo 679 aminokyselín. Komplex α -helixov a β -skladaných listov (Houda, 2011).



Obrázok 8 Cesty hemového a nehemového železa v organizme (Hrtánková, 2012).

3.2 Transport a bunkový príjem

Akonáhle železo v potrave z hemových alebo nehemových zdrojov realizuje svoju črevnú absorpciu, putuje ďalej do krvného obehu a do obehu bunkovej a tkanivovej distribúcie pre využívanie a uskladnenie v tele (obr. 10). V obehovom systéme je osud nehemového železa riadený jeho reverzibilnou väzba na glykoproteín plazmy transferín (Trf). Ľudský Trf vyskytujúci sa v plazme bol prvýkrát objavený v roku 1946 (Schade, Coroline, 1946). Trf je proteín, ktorý má dve funkčné väzbové miesta pre Fe^{3+} . Reverzibilný záväzný mechanizmus, protonizácie aniónu vedie k uvoľňovaniu železa z Trf. Väčšina nehemového železa cirkulujúceho v krvnej plazme je viazaná na Trf. Odhaduje sa, že približne 0,1% z celkového železa v organizme sa nachádza v Trf (Andrews, 2000). Napriek tomu sú v plazme zdravých jedincov stále nízke koncentrácie netransferínovo viazaného železa (NTBI – nontransferin bound iron) (Valk et al., 2000). Pri chronickom zaťažení organizmu železom koncentrácie NTBI

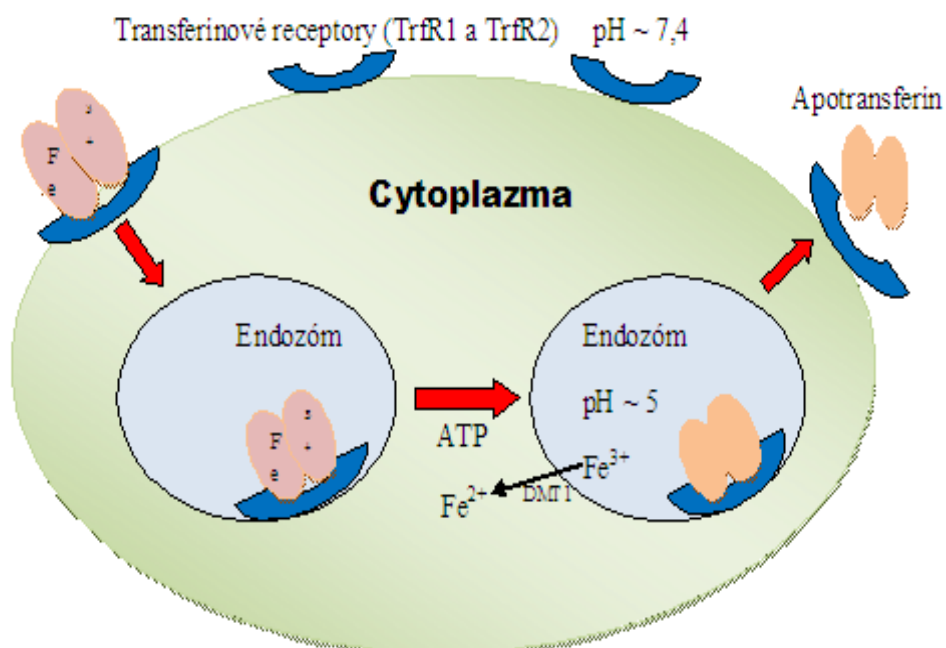
dosahujú vyššie hodnoty (až 4µm) (Burkitt et al., 2001; Grootveld et al., 1989; Jacobs et al., 2005). NTBI môže stimulovať produkciu vysoko reaktívnych foriem kyslíka ako sú hydroxylové (OH[•]) a superoxidové (O₂^{•-}) radikály. Tieto reaktívne formy môžu byť schopné indukovať oxidatívne poškodenie molekúl obehového krvného riečišťa (Darley, Halliwell, 1996). V ľudskom sére bola zistená prítomnosť komplexov Fe³⁺ s citrátom alebo acetátom (Grootveld et al., 1989) avšak všetky presné fyziologické cheláty nie sú známe.

Hlavnou úlohou Trf v obehovom systéme je dodávať železo do vyvíjajúcich sa erytroidných prekursorov a do ďalších významných tkanív tela ako sú pečeň, pankreas, srdce a svaly. Trf zabezpečuje distribúciu železa v celom tele. Dysfunkčné Trf bielkoviny myši vyvolali úmrtie následkom ťažkej anémie (Levy et al., 1999). Okrem toho, spontánne bodové mutácie v génoch Trf u myši viedli k závažným nedostatkom Trf v plazme a nedostatkom železa v erytrodoch s mikrocytárnou anémiou (Huggenvik et al., 1989). Tieto myši mali masívne ukládanie NTBI v pečeni (Huggenvik et al., 1989). U ľudských pacientov s nedostatkom Trf (podmienka známa ako atransferinemia) je sledovaný podobný fenotyp (ťažká anémia systémového preťaženia železom) (Donovan, Andrews, 2004; Heilmeyer, 1961). Účinnosť Trf je 100 – 200 cyklov transportu železa a uvoľnenie do obehu v priebehu jeho životnosti (Aisen et al., 2001). Napriek tejto efektívnosti môžu existovať iné mechanizmy na transport železa v obehovom systéme, pretože v priebehu nedostatku Trf sa v neerytroidných tkanivách kumuluje železo (Andrews, 2000).

Kľúčovým aspektom mechanizmu Trf cyklu pri bunkovom transporte železa je existencia transferínových receptorov TrfR1 a TrfR2, ktoré sa nachádzajú na povrchu bunky (obr. 9). TrfR1 je prítomný vo všetkých bunkách okrem zreých erytrocytov (Emerit et al., 2001), zatiaľ čo TrfR2 je charakteristický pre hepatocyty (Kawabata et al., 1999). Bunkový mechanizmus vychytávania železa cez TrfR1 a TrfR2 zahŕňa efektívny mechanizmus endocytózy s vysokou afinitou receptora. TrfR1 je navyše dobre preštudovaný (Cheng et al. 2004). TrfR2 viaže Trf s významne nižšou väzbovou afinitou ako TrfR1 a to približne 30 - krát nižšou (Hentze et al. 2004).

Mobilný príjem Trf cez receptory sprostredkované endocytózou má niekoľko krokov. Začína priamou a rýchlou väzbou Trf s naviazaným železom na TrfR a vzniká Trf(Fe) – TrfR komplex. Akonáhle prebehne fagocytóza endocytózných váčkov (Alvarez et al., 1990; Girones et al., 1991; McGraw, Maxfield, 1990; Rothenberger et al., 1987), pH vo vnútri endozómu sa zníži na 5,5 až 6,0 pôsobením ATP -

dependentnej protónovej pumpy. Acidifikácia endozómu uľahčuje uvoľňovanie železa z Trf a umožňuje transport železa z endozómu do cytoplazmy cez prenášač DMT1 (Fleming et al., 1998). Následne sa Trf bez naviazaného železa (apotransferin) a TrfR recykláciou sami vrátia na povrch buniek (obr. 9) (Andrews, 2000). Tento mechanizmus endocytózy je tiež známy ako Trf cyklus a vyskytuje sa vo väčšine bunkových typov, vrátane hepatocytov a erytroidných buniek. V obličkách, polarizované epitelové bunky používajú mechanizmus mobilného príjmu zahŕňajúceho megalin závislé cubilin sprostredkovanú endocytózu (Kozyraki et al., 2001). Megalin závislý mechanizmus je považovaný za hlavnú cestu pre dodávky železa do proximálnych tubulov obličiek (Hentze et al., 2004).



Obrázok 9 Transferínový cyklus (modifikované, Strigáčová, 2010).

3.3 Zásoba železa

Feritín je hlavným zásobným proteínom pre ukladanie železa v ľudskom tele (obr. 10). Existuje v rastlinách, bezstavovcoch a baktériách a má veľmi typické trojrozmerné štruktúry. Nové formy feritínu sa zistili napríklad z baktérií *Listeria innocua* (Ilari et al., 2000). Ľudský feritín je heteropolymér zložený z 24 podjednotiek, schopných viazať približne 4500 atómov Fe^{3+} (Arosio and Levi, 2002). Z 24 podjednotiek existujú dva typy reťazcov, ťažké (H) a ľahké (L).

L podjednotky tvoria nukleačné centrum (ukladanie Fe^{3+}), H podjednotka má feroxidázovú aktivitu, ktorou oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} kyslíkom. Podjednotka H feritínu je vďaka feroxidázovej aktivite študovaná pre potenciálny mechanizmus rýchlej detoxikácie železa. L podjednotka feritínu uľahčuje nukleáciu, mineralizáciu a dlhodobé skladovanie železa (Harrison and Arosio 1996; Orino et al., 2001; Zhao et al., 2006).

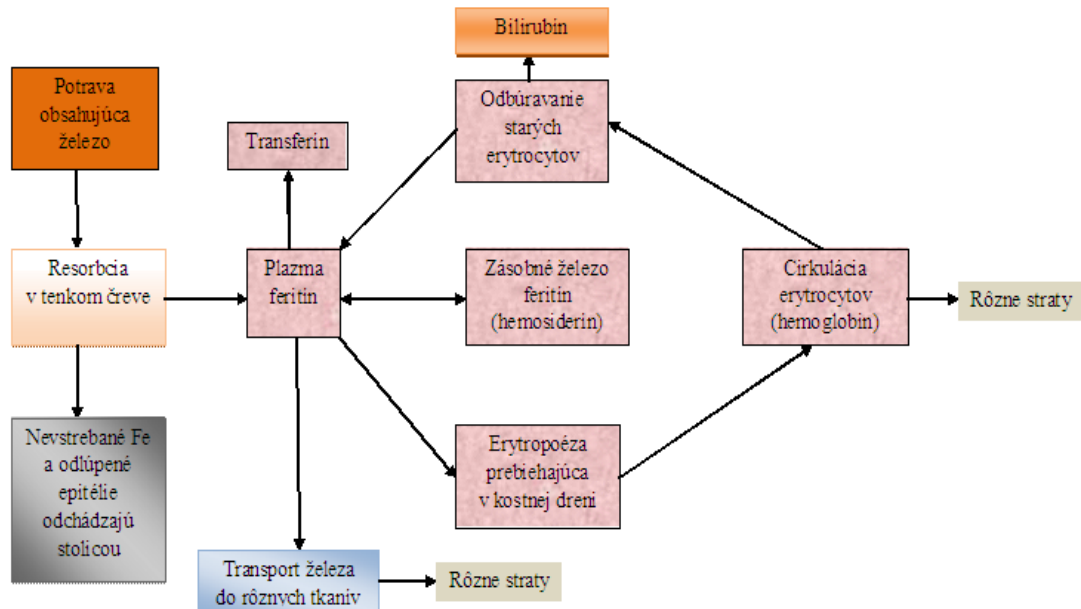
Feritín má významnú úlohu v rade iných ľudských ochorení ako je genetická hemochromatóza, neuroferitinopatia (Crompton et al., 2002; Curtis et al., 2001.) a dedičný hyperferitin-katarakt syndróm (Roetto et al., 2002). Feritín je spájaný aj s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou v dôsledku nadbytku železa v mozgu (Griffiths et al., 1999; Lovell et al., 1998). Hladina železa v mozgu sa s vekom zvyšuje (Gerlach et al., 1994).

Pri mutáciách L-feritínu u človeka bolo zistené, že spôsobuje u dospelých ochorenie bazálnych ganglií (Curtis et al., 2001). Význam feritínu spočíva v oxidácii Fe^{2+} na Fe^{3+} , čím zabraňuje účasti Fe^{3+} na Fentonovej reakcii a tým aj tvorbe ROS (Goldstein et al., 1993; Halliwell, Gutteridge, 1990; Kehrer, 2000).

Ľudský feritín je predovšetkým v cytoplazme buniek (Theile, 2004), ale vyskytuje sa aj v mitochondriách (Drysdale et al., 2002; Levi et al., 2001). Oba majú funkciu ochranných proteínov. Mitochondriálny feritín je menej študovaný než cytoplazmatické formy, a preto zostáva mnoho otázok týkajúcich sa jeho úlohy v homeostáze železa. Analýzy exprese mitochondriálneho feritínu ukázali, že v tkanivách sa ho našlo len málo, ale vo významnom množstve bol objavený v semenníkoch (Drysdale et al., 2002).

Ďalším dôležitým aspektom feritínu v súvislosti s ľudským zdravím je jeho potenciálna úloha pri infekcii a zápale. Degradácia feritínu na hemosiderín predstavuje potenciálne odstránenie toxického katalytického železa prostredníctvom premeny na

hydrát oxidu železitého, typ, ktorý je menej náchylný a katalyzuje tvorbu cytotoxických oxidačných druhov. Mobilizáciou feritínu makrofágy infiltrujúce zápal alebo zranenia tkanív, predstavujú hlavný dôvod produkcie reaktívnych oxidačných foriem, dráždením bakteriálnych patogénov. Ďalšou komplikujúcou možnosťou je, že bakteriálne patogény majú feritín známy ako "mini-feritín" alebo Dps proteíny (DNA-binding proteins from starved cells) (Liu, Theile, 2005). Experimentálne údaje naznačujú, že tieto mini-feritíny hrajú úlohu pri ochrane bakteriálnej DNA z expozície železných iónov a peroxidu vodíka pri zápalových odpovediach (Andrews et al., 2003; Ceci et al., 2003; Grant et al., 1998), a preto poskytujú určité nedefinované úrovne bunkovej odolnosť voči oxidačnému poškodeniu spôsobenému zápalovými bunkami (Kauko et al., 2004; Zanotti et al., 2002). Výskyt zápalu v celom rade ľudských ochorení (napr. hemochromatóza, kongestívne srdcové zlyhanie, alkoholická pečenevá fibróza, rakovina pľúc, reumatoidná artritída, Crohnova choroba atď), zdôrazňuje významné spojenie feritínu so zápalovými bunkami (napr. povrchový apoproteín D), jeho úlohu v celkovom vývoji a možný vplyv na reguláciu zápalovej reakcie.



Obrázok 10 Prehľad metabolizmu železa v organizme (Trojan et al., 2003).

4 Regulačné mechanizmy hladiny železa

Na bunkovej úrovni prebieha koordinácia expresie proteínov zapojených do príjmu, transportu a uskladnenia železa. Táto regulácia zahŕňa ovplyvňovanie transkripcie, stability mRNA, translácie a posttranslačné úpravy. Najlepšie preštudovaný je systém založený na pôsobení dvoch cytoplazmatických proteínov, označovaných ako IRP1 a IRP2 (iron regulatory proteins), ktoré vo vzťahu k aktuálnej hladine železa v bunke ovplyvňujú prepis mRNA vyššie uvedených génov (Muckenthaleret al., 2008).

4.1 Posstranskripčné mechanizmy regulácie bunkového metabolizmu železa

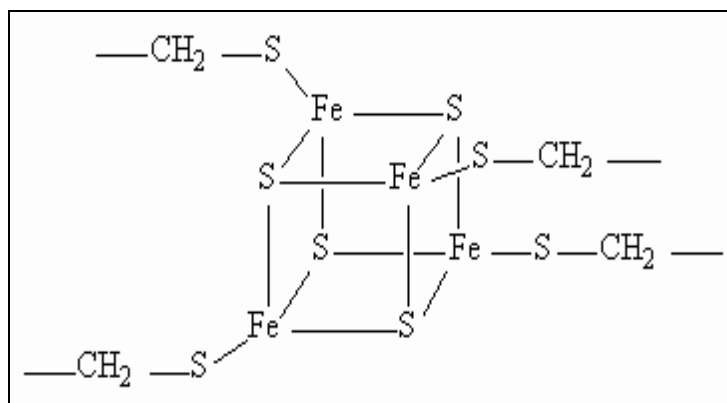
Dvojica intracelulárnych proteínov u cicavcov nazývaných ako regulačný proteín 1 (IRP1) a regulačný proteín 2 (IRP2) existuje v cytoplazme buniek a plnia funkcie v posttranskripčnej regulácii expresie niekoľkých významných génov zapojených do metabolizmu železa (Klausner et al., 1993; Rouault, 2006). Medzi gény, ktorých sa tento regulačnýmechanizmus dotýka patria mRNA feritínu H a L - podjednotky (Leibold et al., 1990), TfR1 (Leibold, Munro, 1988), feroportín (Abboud, Haile, 2000) a DMT1 (Gunshin et al., 1997). Väčšina molekulárnych a bunkových štúdií IRP1 a IRP2 sa sústredili na interakciu týchto proteínov s mRNA feritínu a TrfR1 (transferrin receptor) v reakcii na zmeny intracelulárnej koncentrácie železa. IRP1 a IRP2 menia expresiu týchto génov pri tvorbe komplexu s vysokou afinitou medzi IRP proteínmi a udržiavanou kmeňovou slučkovou štruktúrou na mRNA označovanou IRE (iron – regulatory element), ktorý bol prvýkrát zaznamenaný v roku 1987 (Aziz and Munro, 1987; Hentze et al., 1987; Leibold and Munro, 1987). Štúdie týchto sekvencií ukázali, že jeden IRE sa nachádza na 5' konci H a L-podjednotky feritínu, a päť sekvencií IREs zasa na 3' konci TrfR1 (Klausner et al., 1993; Wallandera et al., 2006).

V prípade IRE na 3' konci TrfR1 sa ukázalo, že obsahuje prvok nestability, umožňujúci citlivosť na degradáciu ribonukleázou (Binder et al., 1994; Casey et al., 1989; Mullner et al., 1989; Mullner, Kuhn, 1988). Pri nízkej intracelulárnej koncentrácii železa sa IRP1 a IRP2 aktivujú a viažu na IREs sekvencie mRNA feritínu a mRNA Trf. Proteín IRP1 sa viaže na 5' koniec mRNA feritínu a výsledkom tejto väzby je inhibícia translácie proteínu feritínu. Proteín IRP2 sa viaže na IREs sekvencie na 3' konci mRNA TrfR1. Výsledkom IRP2 väzby k jednému alebo viacerým IREs na 3' konci TrfR1 je ochrana 3' konci mRNA pred endonukleolytickým štiepením a rozkladom, čím je zvýšená syntéza TrfR1 a bunkový príjem železa.

Pri vysokej koncentrácii vnútrobunkového železa sa IRP1 a IRP2 neviažu k príslušným IREs vo feritíne a TrfR1 mRNA, čo má za následok adaptívnu bunkovú odozvu na vysokú hladinu železa so zvýšenou syntézou feritínu, aby uloženie reaktívneho železa a zníženie syntézy TrfR1 viedlo k zníženiu bunkového príjmu železa a tým k zabráneniu cytotoxicity. Zvlášť, keď TrfR2 je účastníkom bunkovej absorpcie železa (Johnson, Enns, 2004; Kawabata et al., 1999; Robb, Wessling-Resnick, 2004) a jeho úloha nie je regulovaná IRP. Experimentálne štúdie ukazujú, že schopnosť IRP1 a IRP2 viazať sa na IREs bola vytvorená v niekoľkých rôznych bunkových líniach. Tieto posttranskripčné interakcie medzi IRP a IRE sú označované ako IRP-IRE regulačný systém (Casey et al., 1988; Mullner et al., 1989). IRP1 a IRP2 majú podobné sekvencie a sú členmi rodiny génov akonitázy (Hentze, Argos, 1991; Kennedy et al., 1992; Rouault et al., 1991). Ľudské IRP1 a IRP2 gény sa navzájom zhodujú na 56% (Rouault 2006). Avšak len IRP1 má enzymatickú aktivitu akonitázy (Kaptain et al., 1991) a jeho kryštalická štruktúra ukazuje, že sa v skutočnosti podobná mitochondriálnej akonitáze (Dupuy et al., 2006; Robbins, Stout, 1989), čo je enzým zúčastňujúci sa Krebsovho cyklu. Aby došlo k tvorbe akonitázy, je nutná prítomnosť vysokej hladiny železa, čo je signálom pre IRP1 vytvoriť svoju kubickú štruktúru - [4Fe-4S] klaster, skrátene označovaný ISC (iron sulphur cluster) (obr. 11) (Haile et al., 1992), pôsobiaci ako cytozóllový senzor hladiny železa (Rouault et al., 1992; Rouault, Klausner, 1996). Fe – S klaster je nestabilný a môže meniť svoju úlohu podľa hladiny železa. Pri nízkej hladine železa sa aktivuje a viaže k IREs (Haile et al., 1992). Proteín IRP1 je citlivý na kyslík (napr. O^{2-} , H_2O_2 , $NO\cdot$), exogénne a endogénne oxidanty (napr. paraquát,

formaldehyd) a látky pôsobiace ako substráty, ktoré vedú k tvorbe oxidačného stresu (Ayaki et al., 2005; Cairo et al., 2002; Meyron-Holtz et al. 2004; Miret et al., 2003; Missirlis et al., 2003; Mueller, 2005; Orino et al., 2001; Starzynski et al., 2005). Nedávno bolo zistené, že i samotný etanol, ktorý je súčasťou metabolizmu myši môže aktivovať IRP1 alebo IRP2 proteíny (Harrison-Findik et al., 2006). Nakoľko je normálny bunkový metabolizmus v mitochondriách bohatý na oxidačné reakcie a IRP1 sa štrukturálne a funkčne podobá mitochondriálnej akonitáze, je možné, že existuje vzťah medzi mitochondriálnymi a cytoplazmatickými cestami metabolizmu železa. Niekoľko experimentálnych dôkazov podporuje úlohu mitochondrií pri aktivácii IRP1 na cytoplazmatickú akonitázu (Bouton et al., 2002; Chen et al., 1998; Seznec et al., 2005; Wingert et al., 2005). V skutočnosti ide o biochemické zhromažďovanie [4Fe-4S] klastru IRP1, poskytujúce charakteristický rys pre snímanie hladiny železa v porovnaní s IRP2. IRP2 nie je schopný vytvoriť [4Fe-4S] klaster, a preto nemá enzymatickú aktivitu akonitázy (Guo et al., 1994).

Množstvo štúdií s izolovaným živočíšnym tkanivom poukazuje na význam IRP1 ako kľúčového proteínu IRE. Tento predpoklad podporuje skutočnosť, že vysoké množstvo IRP1 sa nachádza v pečeni, ktorá je hlavným orgánom pre uskladnenie železa. IRP2 proteíny sú zasa hlavným senzorom cytoplazmatického železa (Galy Et al., 2005; Vaute et al., 2001; Meyron-Holtz et al., 2004; Starzynski et al., 2005). Dominantnú úlohu IRP2 pri regulácii intracelulárnej hladiny železa cez väzbu IRE dokazuje i to, že IRP2 má väčšiu IRE väzbovú aktivitu pri nízkej hladine kyslíka (Meyron-Holtz et al., 2004). Pri vyšších hladinách kyslíka dochádza k rozpadu [4Fe-4S] klastru (obr. 11), a tým k aktivácii bez akonitázovej formy proteínu, ktorá je schopná viazať sa na IRE. Cieľovým odstránením IRP1 dôjde k zvýšeniu väzbovej aktivity a expresie IRP2 (Meyron-Holtz et al., 2004). IRP2 má hlavnú úlohu ako väzbový proteín IRE pri fyziologických hladinách kyslíka.



Obrázok 11 Feredoxín v prípade Fe₄-S₄ proteínov tvorí prostetickú skupinu zhluk (cluster) štyroch iónov železa a štyroch sulfidových iónov. Skupina je spojená s proteínom cysteínovými ligandami (Túmová, 2009).

4.2 Hepcidín

Kľúčovú úlohu v metabolizme železa má hepcidín (HAMP-hepcidin antimicrobial peptide) objavený Krausom v roku 2000 (Krause et al., 2000). Ide o proteín s baktericídnu aktivitou (Gnaz et al., 2001), ktorého syntéza je v hepatocytoch regulovaná najmä hemjuvelínom (HJV) (Papanikolaou et al., 2004), génom pre hemochromatózu (HFE) a transferínovým receptorom 2 (TrfR2).

4.2.1 Význam hepcidínu

Hepcidín je 25 – aminokyselinový peptid, ktorý bol po prvýkrát objavený v moči a plazme len nedávno a to v priebehu hľadania nových antimikrobiálnych peptidov (Ganz, 2003; Krause et al., 2000). Prvý návrh toho, že hepcidín je zapojený do metabolizmu železa, bol dokázaný metódou subtraktívnej hybridizácie (metóda porovnávania dvoch vzoriek – tester a driver, kde jedna obsahuje hľadaný transkript a druhá nie, driver je vždy v nadbytku a hľadaný transkript neobsahuje) medzi pečňou myši s nadbytkom železa a pečňou kontrolných zvierat (Pigeon et al., 2001). V tomto experimente bolo výrazné zvýšenie hladiny pečňového mRNA hepcidínu v dôsledku podávania chemických zlúčenín železa. Naopak pri nedostatočnom množstve železa v potrave zvierat, došlo k zníženiu hladiny pečňovej mRNA hepcidínu. Kľúčová úloha

hepcidínu v regulácii metabolizmu železa sa prvýkrát uvádza ako náhodný objav Nicolasa v roku 2001 s použitím transkripčného faktora myši USF2 (upstream stimulatory factor 2). Hoci samotný gén USF2 nie je zapojený do metabolizmu železa, jeho neúmyselné narušenie vytvorilo nechcený vplyv na okolie génov hepcidínu, Hpc1 a Hpc2, a tak myšiam chýbala väčšia časť mRNA hepcidínu. Myšie hepcidínové gény Hpc1 a Hpc2 sa odlišujú funkčne a výrazné sú aj rozdiely v ich tkaninovej distribúcii (Lesbordes-Brion et al., 2006; Lou et al., 2004). Narušenie Hpc1 a Hpc2 vyústilo u myši v hemochromatózu. Ľudia majú len jeden typ hepcidínu HAMP (hepcidin antimicrobial peptide), prevažne exprimovaný v pečeni (Ganz, 2004). Prítomnosť hepcidínu bola zistená nielen v pečeni a črevách, ale aj v slezine, pľúcach, krvi a svaloch (Rivera et al., 2005). Úlohu hepcidínu v ľudských chorobách spôsobených železom potvrdili štúdie heraditárnej hemochromatózy (Roetto, 2003). Narušenie génu hepcidínu môže viesť k vzniku juvenilnej hemochromatózy, ktorá je najzávažnejšou formou ľudského ochorenia zapríčineného železom.

4.2.2 Mechanizmus pôsobenia hepcidínu cez feroportín

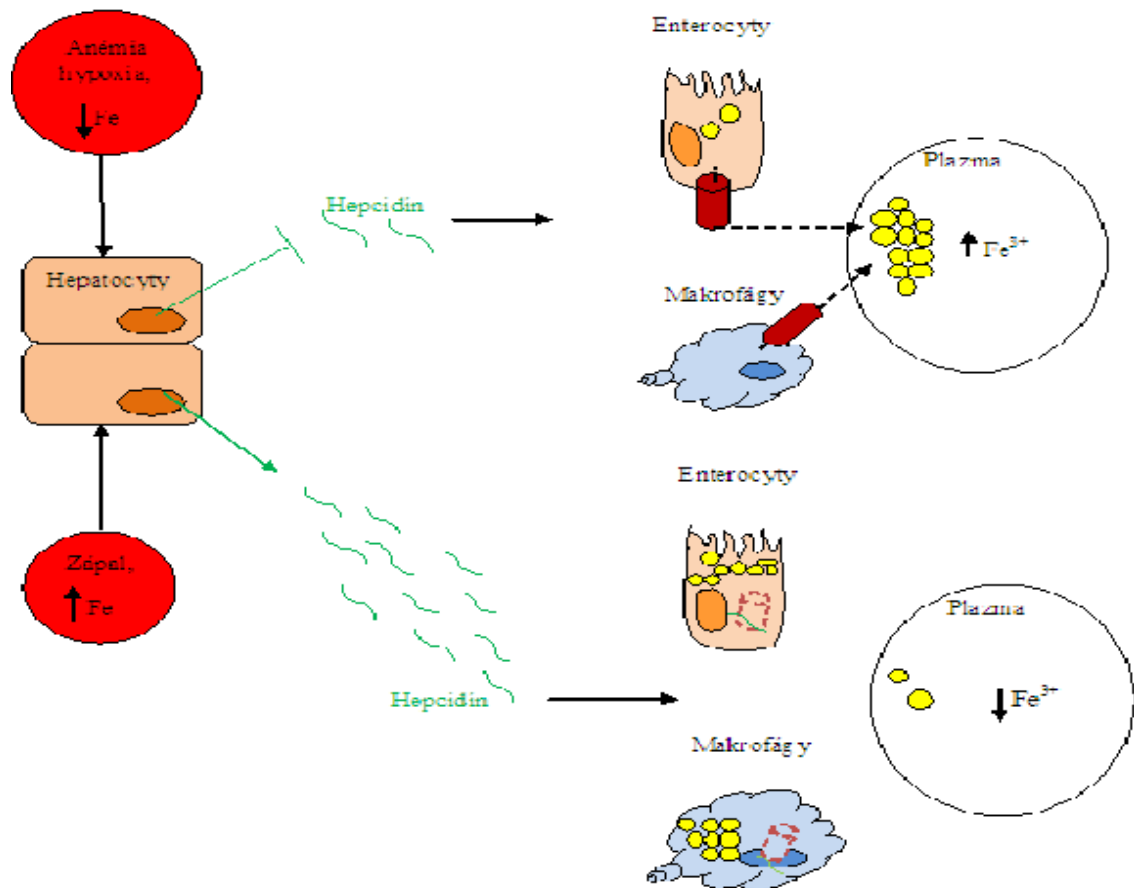
Ako bolo uvedené už skôr, export železa z buniek sa uskutočňuje prostredníctvom feroportínu ako jediného známeho prenášača bunkového železa. Feroportín sa nachádza na bazolaterálnej membráne enterocytov, hepatocytov a makrofágov (Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000; Wessling-Resnick, 2006). Hpcidín pôsobí tak, že znižuje funkčnú aktivitu feroportínu v týchto bunkách (Knutson et al., 2005; Nemeth et al. 2004). Hpcidín sa priamo viaže na feroportín, indukuje jeho internalizáciu z povrchu bunky a následne jeho degradáciu v lyzozómoch (Knutson et al., 2005; Nemeth et al., 2004). Hpcidín reguluje uvoľnenie železa z buniek (enterocytov, makrofágov a hepatocytov) degradáciou feroportínu. Enterocyty, makrofágy a hepatocyty sú hlavné bunky, ktoré najvýznamnejšou mierou ovplyvňujú hladinu železa. Hpcidín je syntetizovaný v pečeni, odtiaľ cirkuluje do tenkého čreva, kde reguluje absorpciu železa z potravy. Degradácia feroportínu v enterocytoch vedie k poklesu transportu železa cez dvanástnik do plazmy, čím účinne znižuje jeho vstrebávanie zo stravy. Keď dôjde k poklesu železa v strave alebo sa vyskytuje vrodené zaťaženie železom, zvýši sa expresia pečeneového hepcidínu a tým sa zabráni nadmernému príjmu železa, čo je pravdepodobná prevencia pred toxikologickými

prejavmi (Ahmad et al., 2002; Mazur et al., 2003; Nemeth et al., 2004; Pigeon et al., 2001). Tento negatívny regulačný mechanizmus môže vysvetliť skutočnosť, že makrofágy obsahujú vysoké hladiny železa pri zápalových štádiách, kde sú pozorované vysoké hladiny hepcidínu (Ganz, 2006). Keď je hladina železa nízka, produkcia hepcidínu v pečeni je potlačená, čo umožňuje export železa feroportínom z enterocytov do plazmy .

4.2 3 Hepcidín a hemochromatóza

Dnes je zrejme, že hepcidín má úlohu v mnohých genetických základoch ľudských chôrob vedúcich k preťaženiu železom. Abnormality v regulácii hepcidínu pri vstrebávaní železa z potravy sú taktiež zodpovedné za ľudské ochorenia z nadbytku železa, napr. hemochromatóza, juvenilná hemochromatóza anémia (Fleming, Bacon, 2005; Ganz 2003; Roetto et al., 2003). Expresia mRNA hepcidínu v pečeni je neprimerane zdokumentovaná u pacientov s rôznymi mutáciami hemochromatózy (Bridle et al., 2003; Lanzara et al., 2004; Lee et al., 2004; Merryweather-Clarke et al., 2003; Papanikolaou et al., 2005; Roetto et al., 2003). U pacientov s anémiou sa vylučovanie tohto hormónu zvyšuje až 100 – krát (Nemeth et al., 2003) a ďalšie chronické anémie u ľudí sú taktiež spojené s výrazným nárastom expresie mRNA hepcidínu (Kearney et al., 2005; Weinstein et al., 2002). Anémiu charakterizuje pokles počtu červených krviniek, a preto by vplyv zvýšenej hladiny hepcidínu na abláciu bunkového exportu železa vysvetlil vplyv na ich životaschopnosť. U niektorých ľudí spôsobuje genetická ablácia HAMP (hepcidin antimicrobial peptide) najzávažnejšie ochorenie spojené s nadbytkom železa a tým je juvenilná hemochromatóza (Roetto Et al., 2003). U myší s deficitom hepcidínu, kvôli heterozygótnej mutácii hepcidínového génu, sa vyskytuje zvýšená akumulácia železa (Nicolas et al., 2004). Na druhej strane nadmerné množstvo Hpc1 u transgénnych myší malo za následok ťažké anémie z nedostatku železa. U myší s experimentálne vyvolaným zápalom, kde použili ako rozpúšťadlo terpentínový olej, je expresia mRNA hepcidínu indukovaná až štvornásobne (Nicolas et al., 2002). Alkoholické ochorenia pečene sú úzko spojené so zvýšenou akumuláciou železa v pečeni, čím vzniká hemochromatóza (Fletcher and Powell, 2003; Niemela et al., 1999). Tieto zistenia podporujú aj údaje získané na zvieracích modeloch, ktoré ukázali, že chronická konzumácia alkoholu je dôvodom

akumulácie nehemoveho železa v pečeni (Batey, Johnston, 1993; Sanchez et al., 1988; Valerio et al., 1996). Tri nezávislé štúdie potvrdili, že výška hepcidínu poklesla pri podávaní alkoholu, ktorého účinok by vysvetľoval zvýšenie transportu železa v dvanástniku, čo vedie k zvýšeniu železa v potrave a tým pádom k preťaženiu železom (Valerio, Petersen 2000).



Obrázok 12 Regulácia homeostázy železa hepcidínom. Regulácia systémovej homeostázy železa (Fe) hepcidínom. Hepcidín blokuje uvoľňovanie Fe z enterocytov a makrofágov, pretože sa viaže na ferroportin (červený valec) a spôsobuje jeho internalizáciu a degradáciu (valec s prerušovanou čiarou). Syntéza hepcidínu je stimulovaná zápalom a vysokou koncentraciou Fe (↑). Naopak anémia, hypoxia a nízka koncentrácia Fe (↓) blokujú syntézu hepcidínu, čo vedie k zvýšeniu koncentrácie Fe v plazme (modifikované, Horváthová, Pospíšilová, 2010).

4.2.4 Hepcidín a vedecký výskum

V súčasnej dobe je doslava explózia základného a aplikovaného výskumu s cieľom stanoviť presnú úlohu a mechanizmu spôsobenia hepcidínu pri preťažení organizmu železom, zápalových poruchách, regulácii hypoxie, anémiách a ďalších fyziologických abnormalitách. Predpokladá sa, že samotný hepcidín môže byť kľúčom k objasneniu zložitých zdravotných problémov súvisiacich s poruchami homeostázy železa. Syntéza tohto hormónu je teda vyvolaná príjmom železa v potrave, zápalmi a infekciami, a naopak, je potlačený nedostatkom železa v potrave, anémiou a hypoxiou. Mechanizmus účinku zahŕňa priamu väzbu a degradáciu ferroportínu ako jediného známeho mobilného prenášača železa. Pochopenie možnej interakcie hepcidínu ďalej ovplyvňuje klinické postupy v liečbe chorôb týkajúcich sa železa. Posledné vedecké pokroky hovoriace o hepcidíne poukazujú na možné terapeutické využitie hepcidínu na liečbu hemochromatóz a anémie (Ganz, 2003). Napríklad nedostatok hepcidínu môže prispieť k nadbytku železa, čo by mohlo viesť k prípadnej liečbe hemochromatózy nahradením hepcidínu pomocou optimalizovanej formy peptidu alebo malých molekúl antagonistov určených pre receptory na povrchu buniek (Ganz, 2003). Stavebný toxikologický profil peptidu ako taký je nesmierne dôležitý. Ďalšou zaujímavou otázkou pre potenciálny klinický výskum by mohlo byť, akou mierou môže vstrebávanie železa z potravy ovplyvniť transplantácia pečene. Tejto témy sa dotýkajú aj mnohé ďalšie otázky ako je rozvoj klinických testov na meranie obehu hepcidínu ako biomarkéru pre rôzne stavy, ako je anémia z nedostatku železa, či chronický nadbytok železa v organizme.

5 Voľné radikály

Voľné radikály sú produktami normálnych metabolických pochodov v organizme (Halliwell, Gutteridge, 2007). Podieľajú sa na ochrane organizmu pred cudzorodými časticami, na reprodukčnom procese a aktivujú celý rad enzýmov.

Na druhej strane sú zodpovedné za mnohé patologické stavy a poškodenia buniek. Záujem o stanovenie voľných radikálov stúpa, pretože ich nadmerná produkcia zohráva významnú úlohu pri rôznych ochoreniach, napríklad pľúcne, kardiovaskulárne, onkologické, neurodegeneratívne a ďalšie.

Voľné radikály sú buď elektroneutrálne, alebo majú iónový charakter (aniónový radikál, kationový radikál). Ich reaktivita spočíva v tom, že dokážu svoj nespárený elektrón spáriť s elektrónom iných látok, čím ich vlastne oxidujú, a preto sa nazývajú oxidanty. Môžu reagovať s molekulami lipidov, proteínov a nukleových kyselín a primárne ich poškodzovať a tým následne dochádza k tvorbe produktov, veľmi reaktívnych metabolitov, ktoré môžu byť často aj toxickejšie ako ich materské molekuly, a tak sekundárne poškodzujú bunky i celý organizmus.

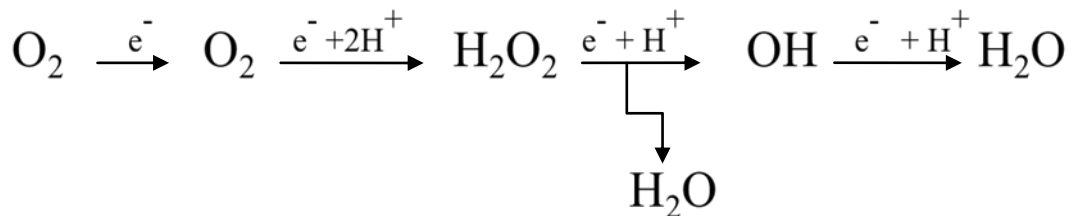
Kyslík sa v tele normálne metabolizuje, ale navyše môže vytvárať potenciálne toxické látky. Voľné radikály vznikajú z molekúl tromi spôsobmi:

- homolytickým štiepením kovalentnej väzby, pričom každý jeden fragment získa jeden nespárený elektrón,
- pridaním jedného elektrónu k normálnej molekule (redukcia),
- stratou jedného elektrónu (oxidácia).

Najvýznamnejšou skupinou voľných radikálov živých systémov sú práve radikály odvodené od kyslíka, označované aj ako reaktívne formy kyslíka-ROS (Reactive Oxygen Species). Práve tieto formy sú hlavnými účastníkmi deštrukcie tkaniva či poškodenia, a tým zároveň narušiteľmi jeho normálnej funkcie (Ďuračková, 1998). Poznáme vnútorné (endogénne) a vonkajšie (exogénne) zdroje voľných radikálov (Rovný, 2009).

Aeróbne organizmy majú schopnosť využívať energiu uloženú v chemických väzbách molekúl živín – substrátov. Tak dochádza k spracovaniu živín oxidatívnym

metabolizmom, pri ktorom sa molekuly substrátov degradujú a kyslík sa redukuje na vodu. Aby sa molekulový kyslík O_2 redukoval až na vodu, musí prijať 4 elektróny. Tie neprijme naraz, ale postupne po jednom. Dôsledkom tohto procesu je vznik krátko žijúcich medziproduktov – voľných radikálov, ktoré obsahujú nespárený elektrón a sú mimoriadne reaktívne. Približne 1 až 3 % vdýchnutého kyslíka sa premieňa na superoxidový radikál, z ktorého môžu vznikať ďalšie reaktívne formy kyslíka, či už iné radikály alebo látky ako peroxid vodíka, ktoré sa vyznačujú vysokou oxidačno-redukčnou aktivitou, hoci radikálmi nie sú (reakcia 1) (Kaplán, Lehotský, 1997):



5.1 Fyziologická tvorba voľných radikálov

Mitochondrie zabezpečujú nielen energetický metabolizmus bunky, ale sú aj hlavným producentom superoxidového radikálového aniónu ($O_2^{\cdot-}$) a peroxidu vodíka (H_2O_2). Superoxid sa podieľa na tvorbe ďalších reaktívnych foriem kyslíka (ROS). V peroxizómoch je zdrojom tvorby superoxidového radikálového aniónu xantínoxidáza. Obsahuje molybdén a patrí medzi Fe – S flavínové hydroxylázy a katalyzuje hydroxyláciu purínov a to konkrétne hypoxantínu na xantínaž kyselinu močovú. Molekulový kyslík sa redukuje na superoxidový radikálový anión a následne na peroxid vodíka. Za dôležitý zdroj tvorby peroxidu vodíka v peroxizómoch sa považuje aj oxidácia mastných kyselín v pečenejých bunkách kvôli dlhodobému hladovaniu (Jomová et al, 2010).

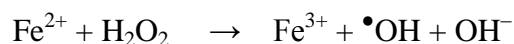
5.2 Oxidačný stres

Oxidačný stres vzniká dôsledkom negatívneho pôsobenie voľných radikálov a reaktívnych metabolitov kyslíka alebo dusíka. Oxidačný stres môžu spôsobiť niektoré látky životného prostredia alebo zlyhanie antioxidantnej obrany. Oxidačný stres znamená prevahu oxidačných častíc nad bunkovými antioxidantami v živých bunkách, kedy sa porušuje rovnováha medzi tvoriacimi sa radikálmi a ich prirodzenými vychytávačmi. Ak produkcia voľných radikálov pri oxidácii živín alebo pri iných reakciách v organizme prevýši kapacitu obranných mechanizmov, dochádza k oxidačnému stresu, ktorý môže viesť k poškodeniu tkaniva alebo orgánu (Kaplán, Lehotský, 1997). Tak oxidačný stres zohráva úlohu pri vzniku alebo rozvoji mnohých ochorení.

5.3 Účasť železa na produkcii voľných radikálov

Tvorba voľných radikálov je úzko spojená aj so železom ako redoxne aktívnym kovom. Hoci regulačné mechanizmy bunky zabezpečujú, že v organizme nie je prítomné „voľné“ (neviazané) železo, pri strese sa v podmienkach *in vivo* superoxidový anión radikál vyskytuje vo zvýšenom množstve a pôsobí ako oxidant proteínov obsahujúcich nehemové viazané železo [4Fe-4S]. Tým sa uvoľňuje „voľné“ železo. Uvoľnenie železa účinkom superoxidového aniónového radikálu bolo dokázané v [4Fe-4S] enzýmoch rodiny dehydratáz – lyáz.

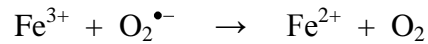
Takto neviazané železo sa môže zapojiť do Fentonovej reakcie a dochádza k produkcii vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu (Valko et al., 2005):



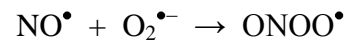
Superoxidový radikál participuje v Haber – Weissovej reakcii



ktorá kombinuje Fentonovu reakciu a redukciu Fe^{3+} superoxidom za vzniku Fe^{2+} a kyslíka:



Pri určitých podmienkach môže superoxidový anión radikál reagovať s oxidom dusíka za vzniku významného množstva oveľa silnejšieho oxidačného peroxodusitanového radikálu.



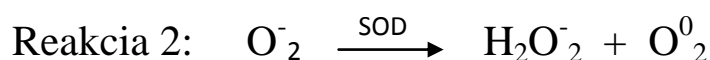
Účinkom voľného redoxne aktívneho železa v bunkách dochádza ku tvorbe ROS a katalýze peroxidácie lipidov. Pri peroxidácii lipidov spúšťa voľný radikál reťazovú reakciu medzi nenasýtenými mastnými acylovými skupinami v bunkových membránach a molekulovým kyslíkom. Dôsledkom oxidačného poškodenia sú nefunkčné membrány a smrť buniek.

Schopnosť iónov železa, ako aj iných prechodných kovov, podstúpiť oxidáciu alebo redukciu z nich robí potenciálnych partnerov pre chemické reakcie zahŕňujúce biologické voľné radikály. Nie je náhodou, že superoxiddismutáza, enzým, ktorý katalyticky ničí radikály superoxidu tým, že ho dismutuje na peroxid vodíka a kyslík, obsahuje v aktívnom mieste 3 rôzne prechodné kovy (Mn, Cu alebo Fe).

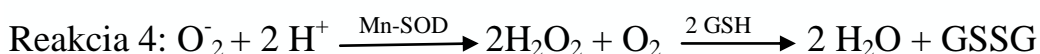
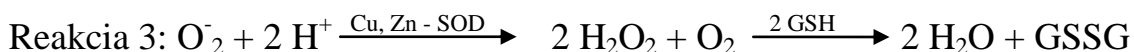
6 Antioxidanty

U aeróbných organizmov existujú účinné obranné mechanizmy proti trvalému pôsobeniu voľných radikálov – antioxidačné systémy. Antioxidanty, jednotlivé alebo v kombináciách, chránia pred oxidatívnym poškodením voľnými radikálmi a to neutralizáciou ich toxického účinku.

Mitochondrie sú nielen miestom tvorby voľných radikálov, ale aj miestom bohatým na antioxidanty. Patria medzi ne predovšetkým enzýmy ako superoxiddismutáza (SOD) s rôznou lokalizáciou v bunkách, ktorá katalyzuje premenu superoxidového radikálu na peroxid vodíka a kyslík (reakcia 2) (Kaplán, Lehotský, 1997). Okrem enzýmov sem zaraďujeme aj aj látky neenzýmovej povahy, ktorými sú vitamíny.



Mitochondrie sú bohaté na antioxidanty vrátane glutatiónu (GSH) a enzýmov ako superoxiddismutáza (SOD) a glutatión peroxidáza (GPx), prítomné na oboch stranách membrán ako minimalizátory oxidačného stresu. Superoxidové radikálové anióny na oboch stranách mitochondriovej membrány sa aktivitou Cu, Zn – SOD (SOD1 - lokalizovaná v cytoplazme) (reakcia3) a Mn – SOD (SOD2 – lokalizovaná v matrix mitochondrií) menia na peroxid vodíka (reakcia 4) a pôsobením glutatión peroxidázy na vodu. Glutatión peroxidáza vyžaduje prítomnosť peptidu glutatiónu (GSH), ktorý sa pôsobením peroxidu vodíka alebo iných organických hydroperoxidov oxiduje na GSSG:



Ďalšími zložkami primárneho obranného systému sú teda látky neenzýmovej povahy, kam zaraďujeme vitamíny A, B6, C a E (Kaplán, Lehotský, 1997). Vitamíny samostatne alebo v kombinácii s inými antioxidantmi regulujú ROS generácie,

podporujúce uvoľňovanie železa z proteínového komplexu ako je už spomínaný mitochondriálny železo-síra kluster (obr. 11), transferín (5) a feritín (obr. 7) (Chow, 2009). Taktiež zmierňujú nepriaznivé účinky z nadbytku železa alebo dusitanovej liečby.

7 Neurodegeneratívne ochorenia

Vážnym problémom súčasnej neurológie je problém degeneratívnych ochorení nervového systému. Odborníci túto skupinu ochorení nazývajú systémové ochorenia a atrofie alebo heredofamiliárne degeneratívne ochorenia nervového systému. Napriek tomu neurodegeneratívne ochorenia predstavujú i pri súčasných obrovských pokrokoch v genetike a molekulárnej biológii ešte stále pomerne kontroverznú skupinu nervových ochorení alebo celkových ochorení organizmu vrátane porúch nervového systému (NS) (Varsik et al., 2004). V súvislosti s týmito ochoreniami sa často stretávame s degradáciou nervovej bunky a nervového systému (Waller, 1848). Ide o postupné oslabenie životných funkcií a biologicky nepriaznivú premenu z generácie na generáciu. Tento pojem sa používa pre opísanie morfológických zmien v mechanicky poškodenom periférnom nerve, preto sa bežne označuje aj ako Wallerova degradácia. Názov degeneratívne ochorenia sa pomaly nahrádza skupinou genetických porúch a stáva sa súčasťou kapitol o demenciách, poruchách postúry a pohybu, ataxiách, poruchách senzorických funkcií a podobne (Rowland et al., 2000). 21. storočie prinieslo nové poznatky o štrukturálnych zmenách buniek (bunkové organelopatie, mitochondriálne, peroxizómové, lyzozómové a ďalšie poruchy) a o poruchách biochemizmu buniek, najmä dôkazy o prítomnosti niektorých patologických substrátov, hlavne proteínov (Varsik et al., 2002).

7.1 Alzheimerova choroba

Senilná demencia Alzheimerovho typu (SDAT-Senile dementia of the Alzheimer type) alebo Alzheimerova choroba (AD-Alzheimer Disease) je stále častejšia v rozvinutých krajinách, kde populácia obsahuje viac a viac starších ľudí, hoci nie je žiadny známy dôvod k tomuto ochoreniu. Často nie je známe prečo sa niektorí ľudia s touto demenciou stretnú už v 30-tom alebo 40-tom roku svojho života, zatiaľ čo iní o nej nemajú ani tušenia do konca 70.-80. rokov života. Vo veku 60 rokov trpí touto chorobou menej než 1% populácie, kým vo veku 85 rokov je to už štvrtina až tretina osôb. Tak sa pri starnutí populácie stáva AD prevládajúcou. Familiárne prípady s definovaným účtom dedičnosti AD sú asi 10%. Genetické vady u familiárnych prípadov boli zistené na 4 chromozómoch (Blennow et al., 2006):

Tabuľka 3 Prehľad chromozómov a ich génov (Blennow et al, 2006)

Chromozóm	Gén
21	Prekurzorový proteín amyloid (APP)
19	Apoliproteín E (ApoE)
14	Presenilín 1 (PSEN1)
1	Presenilín 2 (PSEN2)

Tzv. prípady so „skorým nástupom“ AD vo veku 30, 40 a 50 rokov majú genetický základ súvisiaci s APP (Amyloid Precursor Protein), PSEN1 (Presenilin 1) a PSEN2 (Presenilin 2) génmi. AD prípady spojené s APP genetickým defektom na chromozóme 21. majú vysvetliť výskyt Alzheimerovej choroby u osôb s Downovým syndrómom prevažujúcim do stredného veku. APP kóduje amyloid, čo vedie k fibrilárnej agregácii beta-amyloidu, ktorý je toxický pre neuróny. Asi polovica predchádzajúcich prípadov vzniku AD sú spojené s mutáciou génu presenilínu 1 na chromozóme 14. Gén presenilínu 2 bol objavený na chromozóme 1, ale tento nedostatok predstavuje menej ako 1% prípadov (Ertekin-Taner, 2007). Typickejšie prípady s „neskorým nástupom“ AD, ku ktorým došlo po 60 rokoch môžu mať základ v genetických chybách. Genetický lokus na chromozóme 19 kóduje transportér cholesterolu tzv. apoliproteínu E (ApoE). ApoE zvyšuje ukládanie fibrilárneho beta-amyloidu, čo môžeme nájsť v 40% prípadov AD. Prítomnosť ApoE nie je potrebná, ani dostatočná pre rozvoj AD. Mutácie génu kódujúceho proteín tau tau, ktorý je spojený s mikrotubulmi možno nájsť v niektorých prípadoch AD. Abnormálny tau môže zodpovedať za skrutkovicové vlákna nájdené v neurofibrilárnej spleti (Ertekin-Taner, 2007). Bezohľadu na príčinu je diagnóza AD z klinickej stránky progresívnou stratou pamäte s rastúcou neschopnosťou podieľať sa na bežných denných aktivitách. V neskoršom priebehu ochorenia, postihnuté osoby nie sú schopné rozpoznať členov rodiny a nemusia vedieť ani kto sú. Pri pitve možno hrubo vidieť atrofiu mozgu, predovšetkým v frontálnej, temporálnej a parietálnej oblasti, a tak dochádza v exvakuu k ventrikulárnej dilatácii. V mozgovej kôre dochádza k zvýšeniu počtu neuritických dosiek, ktoré sú zložené z kľukatých neuritických výbežkov okolo centrálného jadra amyloidu. Na okraji týchto dosiek sa môžu objaviť reaktívne astrocyty a mikroglie. Zvýšená prítomnosť týchto dosiek v neokortexe je nutná pre diagnózu AD. Jadro amyloidu tvorí prevažne malý peptid známy ako ôsol, odvodený z väčšieho

nekurzorového proteínu amyloidu (APP). Existujú ešte aj tzv. difúzne dosky, ktoré však nie sú dôležité pre stanovovanie diagnózy AD. Počet dosiek potrebných k diagnóze AD závisí od veku, a tak k ostatným histologickým rysom AD patria neurofibrilárna spleť, amyloid angiopatia a degenerácia granulovakuolár (Mirra et al, 1993; Perl, 2000). Medzi ďalší dôvod vzniku AD radia biochemické dôkazy stratu acetyltransferáz cholínu a acetylcholínu v mozgovej kôre. Práve mnohé liečebné postupy sú založené na znížení strát acetylcholínu. Lieky tohto typu produkujú stredne symptomatické výhody, avšak nedokážu zastaviť progresiu choroby. Mozog napadnutý AD má vyššie straty mozgovej funkcie, čo vedie k hlbkej demencii. Bezprostrednou príčinou smrti u väčšiny osôb s Alzheimerovou chorobou je zápal pľúc a obvyklé aspiračné pneumónie (Klafki et al, 2006).

7.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba bola pomenovaná po britskom lekárovi Jamesovi Parkinsonovi, ktorý ju prvýkrát veľmi podrobne opísal už v roku 1817. Väčšina prípadov Parkinsonovej choroby (PD) je sporadická. Tento syndróm zahŕňa niekoľko chorôb rôznych etiológiou, ktoré predovšetkým ovplyvňujú pigmentované skupiny neurónov, vrátane substancie nigra, miesto ceruleus, jadro hlavového nervu X a substancia innominata. U pacientov sa javí poruchami pohybu, pokojovým trasom (tremorom), svalovou stuhnutosťou (rigiditou), spomalením pohybov (bradykinézou), poruchami postoja a chôdze (posturálna instabilita). Našťastie nedochádza k duševnému rozkladu. Choroba začína v neskoršom strednom veku a pomaly postupuje (Hughes et al, 2005).

Ide o chorobu, ktorá je definovaná ako patologická degenerácia neurónov dopamínu v substancii nigra (SN) a intracytoplazmatická akumulácia bielkovinových inklúzií, známa ako Lewyho telieska (Siderowf, Stern, 2003). Pri tomto ochorení sa 50-70% neurónov stráca už počas diagnózy (Morrish et al., 1998). Neuroprotektívna terapia spomalí, zastaví alebo otočí priebeh progresie ochorenia v doteraz nevyliciteľnej Parkinsonovej chorobe. U pacientov tak dochádza k progresívnej akumulácii železa a feritínu v SN (Soficet al., 1988; Berg et al., 2002).

Hlavné škody na neurónoch sprostredkované železom súvisia s tým, že železo je významným generátorom reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Dostupné množstvo železa Fe^{2+} môže reagovať s peroxidom vodíka (H_2O_2), čím oxidačnými deamináciami vznikajú hydroxylové radikály (OH) poškodzujúce bielkoviny, nukleové kyseliny a membránové fosfolipidy, následne vedúce k bunkovej degenerácii (Gutteridge, 1992). Nedávno sa však na zvieracích modeloch preukázalo, že ochranou proti tomuto pôsobeniu môže byť podávanie N-metyl – 4 – fenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridínu, s čím sú však spojené motorické poruchy. Týmto poruchám môžeme predísť súčasťným podávaním chelátov železa ako R-apomorfinu, zeleného čaju, klioquinolu, ubiquitínu proteáz alebo nadmernou expresiou ťažkej podjednotky železa viažúcej feritín. Odstránia sa tak nielen motorické poruchy, ale zároveň sú chránené aj dopaminové neuróny a udržuje sa aj ich produkcia. Bolo tiež dokázané, že preťaženie organizmu železom uľahčuje fibriláciu synukleínu z človeka a narušuje proteozomálnu činnosť. Parkinsonova choroba je druhým najčastejším neurodegeneratívnym ochorením s poruchami hybnosti.

Záver

V práci sme spracovali prehľad proteínov, ktoré plnia dôležité funkcie v homeostáze železa, regulačných mechanizmov kontrolujúcich expresiu proteínov, ako aj zapojenie železa do tvorby reaktívnych foriem kyslíka vedúcich k oxidačnému poškodeniu biomolekúl a vážnym neurodegeneratívnym ochoreniam.

1. Prínos v regulácii homeostázy železa

Je zaujímavé, že do roku 1980 boli, v súvislosti so železom v živých bunkách, proteíny transferín, transferínový receptor a feritín považované za hlavné regulátory hladiny železa v bunkách. Následný objav IRE-IRP regulačného systému priniesol nový pohľad na koordinovanú reguláciu bunkového metabolizmu železa. V každom prípade však najvýznamnejší prínos v oblasti skúmania regulácie železa bol objav hepcidínu, ktorý je hormonálny „prepínač“ systémovej homeostázy železa. Objavom hepcidínu boli objasnený molekulový základ mnohých ochorení spojených s poruchami železa, ktorý je predpokladom pre vývoj nových liečiv. Pokrok, ktorým je identifikácia génu HFE priniesol cenné informácie k pochopeniu normálneho či abnormálneho metabolizmu železa u ľudí, jeho genetický základ a vzťah ku klinickým prejavom chronickej toxicity železa.

2. Toxicita železa a jej pôvod

Vo výskume realizovanom na pochopenie biochemických a patologických mechanizmov chronickej toxicity železa, existuje niekoľko hlavných hypotéz vrátane oxidačného poškodenia pri tvorbe železa katalyzovaného ROS, lyzozomálnych poškodeniach, dysfunkcií bunkových organel (napr. mitochondrie) a poškodenia DNA. Všetky tieto mechanizmy majú základ v Haber - Weisovej a Fentonovej reakcii, produkujúce toxické ROS, ktoré môžu začať deštruktívne biochemické procesy ako je peroxidácia lipidov, ktorá sa zúčastňuje na ochoreniach a patologických procesov.

Molekulárna charakteristika vrodenných defektov homeostázy železa prispieva k pochopeniu základných princípov fungovania a regulácie tohto procesu. Nové poznatky sa predovšetkým uplatňujú v diferenciálnej diagnostike, ale súčasne sú základom pre vývoj nových liečebných metód. Preto je dôležité neustále rozširovať naše súčasné znalosti o presnej fyziologickej úlohe jednotlivých molekúl a ich prípadné interakci.

Zoznam použitej literatúry

- Abboud, S. – Haile, D. J. 2000. *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular*. In The journal of biological chemistry. ISSN 0021-9258, 2000, roč. 26, č. 275, s. 19906-19912.
- Alison, C. P. et al. 2008. *Iron Oxide Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Inflammation: research work*. Rochester: University of Rochester, 2008, 2 s.
- Andrews, N. C. 1999. *Disorders of iron metabolism*. In The New England Journal of Medicine. ISSN 1537-6516, 1999, roč. 26, č. 341, s. 1986-1999.
- Andrews, N. C. 2000. *Iron homeostasis: insights from genetics and animal models*. In Nat. Rev. Genet. 2000, roč. 1, č. 3, s. 208–217.
- Barton, J. C. et al. 1998. *Management of hemochromatosis*. Hemochromatosis Management Working Group. In Ann Intern Med, 1998, č. 129, s. 932-939.
- Berg, D. et al. 2002. *Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain; Iron in neurodegenerative disorders*. In Neurotox. Res. 2002, č. 2, s. 155-160.
- Beutler, E. 2005. *Hemochromatosis: genetics and pathophysiology*. In Annu. Rev. Med. 2005, č. 57, s. 331–347.
- Cazzola, M. et al. 1998. *Juvenile genetic hemochromatosis is clinically and genetically distinct from the classical HLA-related disorder*. In Blood. 1998, č. 92, s. 2979-2981.
- Ďuračková, Z. 1998. *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne*. 1. Vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. 283 s. ISBN 80-88908-11-6
- Feder, J. N. et al. 1996. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. In Nat Genet. 1996, č. 13, s. 399-408.
- Fleming, R. E. - Sly, W. S. 2001. *Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease*. In Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2001, č. 98, s. 8160-8162
- Gangaidzo, I. T. et al. 1999. *Iron overload in urban Africans in the 1990s*. In Gut. 1999, č. 45, s. 278-283.
- Ganz, T. 2003. *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. In Journal the american society of hematology. ISSN 1528-0020, 2003, roč. 102, č. 3, s. 783-788.

- Ganz, T. et al. 2001. *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. In J. Biol. Chem. ISSN 7806-7810, 3, roč. 2001, č. 11, s. 276.
- Gassner, G. T. et al. 1995. *Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase*. In the Faseb J. 1995, č. 9, s. 1411-1418.
- Gordeuk, V. R. 2002. *African iron overload*. In Semin Hematol. 2002, č. 39, s. 263-269.
- Gutteridge, J. M. 1992. *Iron and oxygen radicals in brain*. In Ann. Neurol. 1992, č. 32, s. 16-21.
- Halliwell, B. - Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine In Toxicology Mechanisms and Methods*. ISSN 1537-6516, 2007, s. 497-517.
- Hardy, J. - Gwin-Hardy, K. 1998. *Genetic classification of primary neurodegenerative disease*. In Science. 1998, č. 282, s. 1075-1079.
- Horák, J. a kolektiv. 2010. *Hemochromatóza*. Havlíčův Brod: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-2299-3.
- Horvathová, M. – Pospíšilová, D. 2010. *Nové poznatky o homeostáze železa jejich důsledky pro klinickou praxi*. In GAČR. 2010, č. 305, s. 13.
- Houda, J. a kolektiv. 2011. *Nové poznatky o metabolismu železa v lidském organismu*. [online]. Olomouc: Laboratoř experimentální medicíny a Dětská klinika LF UP a NF, 2011. [cit.2001.19.01] Dostupné na internete: <<http://www.slidershare.net/jirihuoda/metabolizmuszeleza>>
- Chow, C.K. 2009. *Role of vitamin E in cellular antioxidant defense*. Current Chemical Biology. 2009, č. 3, s. 197-202.
- Kafková, A. 2005. *Anémia-diagnostika a léčba*. In Meduca. 2005, roč. 2, č. 3, s. 141-144.
- Kaplán, P. - Lehotský, J. 1997. *Fyzická zátěž a kyslíkové volné radikály*. In Vesmír. ISSN 0042-4544, roč. 76, č. 6, s. 313-315.
- Kaščák, M. 2011. *Metabolické choroby z nadbytku pečene z nadbytku železa*. In Trendy v hepatologii. ISSN 1337-9836, 2011, roč. 3, č. 1, s. 44-54.
- Keenan, CR. Et al. 2009. *Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells*. In Pubmed. 2009, roč. 43, č. 12, s. 4555-4650.
- Kelly, A. L. et al. 2001. *Classification and genetic features of neonatal haemochromatosis: a study of 27 affected pedigrees and molecular analysis of genes implicated in iron metabolism*. In J. Med. Genet. 2001 č. 38, s. 599–610.

- Krause, A. et al. 2000. *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. In *Trendy v hepatológii*. ISSN 1337-9836, 2000, roč. 3, č. 480, s. 147-150.
- Kunert, J. 1999. *K čemu potřebujeme myoglobin?* In *Vesmír*. 1999, č. 2, s.71-72.
- Logan, J. I. et al. 1994. *Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus*. In *Quart. J. Med.* 1994, č. 87, s. 663-670.
- Luis G. Valerio Jr. 2007. *Iron metabolism*. In *Toxicology Mechanisms and Methods*. ISSN 1537-6516, 2007, s. 497-517.
- M. Ching-Ming Chung. 2010. *Structure and function of transferrin*. In *Biochemistry and Molecular Biology Education*. ISSN 1539-3429, 2010, roč. 12, č.4, s.146-154.
- McKie, A. T. et al. 2002. *Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport*. In *Biochem. Soc. Trans.* ISSN 2002, roč. 30, č. 4, s. 722–724.
- Mcord J. M. 2004. *Iron, Free radicals, and Oxidative Injury*. In *JN*. 2004, roč. 134, č. 11, s. 31715-31725.
- Morrish, P. K. et al. 1998. *Clinical and [18F] dopa PET findings in early Parkinson's disease*. In *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1998, roč. 56, č. 3, s. 597-600.
- Muckenthaler, M. U. - Galy, B. - Hentze, M. W. 2008. *Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network*. In *Annual Review of Nutrition*. ISSN 061807-155521, 2008, roč. 28, č.101, s. 197-213.
- Murray, K. F. - Kowdley, K. V. 2001. *Neonatal hemochromatosis*. In *Pediatrics*. 2001, č. 108, s. 960–964.
- Nemeth, E. et al. 2004. *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. In *Science*. ISSN 1937-9145, 2004, roč. 306, č. 5704, s. 2090-2093.
- Okamoto, N. et al. 1996. *Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis*. In *Hum Genet*. 1996, č. 97, s. 755-758.
- Papanikalaou, G. et al. 2004. *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. In *Trendy v hepatológii*. ISSN 1337-9836, 2004, roč. 3, č. 36, s. 77-82.
- Papanikolaou, G. et al. 2004. *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. In *Nature Genet*. 2004, č. 36, s. 77-82.
- Ponka, P. 1997. *Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells*. In *Journal the american society of hematology*. ISSN 1528-0020, 1997, roč. 89, č. 1, s. 1-25.

- Roetto, A. et al. 2003. *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. In Nat Genet. 2003, č. 33, s. 21-22
- Rovný, I. 2011. *Volné radikály a fajčenie*. In Bedeker zdravia ISSN 1337-2734, roč. 7, č. 1, s. 65-68.
- Siderowf, A. - Stern, M. 2003. *Update on Parkinson disease*. Ann. Intern. Med. 2003, č. 138, s. 651-658.
- Trojan, S. a kolektív. 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2003. 739. ISBN 80-247-0512-0512-5.
- Valko, M. - Morris, H. – Cronin, M.T.D. 2005. *Metals, Toxicity and Oxidative Stress*, In *Current Medicinal Chemistry*, vol. 12, 2005, p. 1161-1208.
- Varsík, P. et al. 2002. *K problematike neurodegeneratívnych ochorení: Iný pohľad na možnosti klasifikácie*. In Neurologie pro prax. 2002, č. 1, s. 33-37.
- Varsik, P. et al. 2004. *Genetická heterogenita a fenotypová variabilita tzv. asociovaných príznakov u neurodegeneratívnych ochorení. Pes cavus*. In 1. neurologická klinika Fn LF, UK Bratislava. 2004, č. 3, s. 164-168.
- Wallander, M. L. - Leibold, E. A. – Eisenstein, R. S. 2006. *Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins*. In BBA. ISSN 0167-4889, 2006, roč. č. 7, s. 668-669.
- Wen Zhu et al. 2007. *Prevention and restoration of lactacystin-induced nigrostriatal dopamine neuron degeneration by novel brain-permeable iron chelators*. In J.the Faseb. ISSN 0021-3835, 2007, č. 21, s. 3835-3844.
- Zachar, D.; *Humánna výživa II.: Živiny*. 1. Vyd. Zvolen; STU, 2004. 218 s. ISBN 80 – 228 – 1293 –5

