

Современи погледи на хомеостазата на железо со основен акцент на хепцидинот – новиот хормон, регулатор на метаболизмот на железо

Билјана Илковска^{1*}, Бисера Котевска², Ѓеорѓи Трифунов²

¹ЈЗУ Клиничка болница д-р Трифун Пановски, Битола, Република Македонија; ²Токуда болница, Софија, Република Бугарија

Извадок

Цитирање: Илковска Б, Котевска Б, Трифунов Ѓ. Современи погледи на хомеостазата на железо со основен акцент на хепцидинот – новиот хормон, регулатор на метаболизмот на железо. Макед Мед Електр С. 2015 Авг 12; 2015; 50010. <http://dx.doi.org/10.3889/mmej.2015.50010>

Клучни зборови: железо; феритин; трансферин; хепцидин.

Кореспонденција: Д-р Билјана Илковска, Димче Лачански бр. 29, 7000 Битола, Република Македонија. Тел.: +389-71-361-262. E-mail: drbiljanailkovska@yahoo.com

Примено: 07-Јул-2015; **Ревидирано** 30-Јул-2015; **Прифатено:** 31-Јул-2015; **Објавено:** 12-Авг-2015

Печатарски права: © 2015 Билјана Илковска, Бисера Котевска, Ѓеорѓи Трифунов. Оваа статија е со отворен пристап дистрибуирана под условите на Непоклизирана лиценца, која овозможува неограничена употреба, дистрибуција и репродукција на било кој медиум, доколку се цитираат оригиналниот(ите) автор(и) и изворот.

Конкурентски интереси: Авторите изјавуваат дека немаат конкурентски интереси.

Железото е есенцијален елемент за скоро сите живи организми. Тој е клучен функционален дел на кислородните транспортери, депонирачките молекули и многу ензими кои ја катализираат редокс реакцијата неопходна за генерирање на енергија, продукти на различни метаболички интермедиери и за одбрана. Истражувањата покажаа дека клучен регулатор во хомеостазата на железото е хепцидинот и го поставија црниот дроб за централен орган во системската хомеостаза на железото. Хепцидинот е катјонски пептид составен од 25 аминокиселини и 4 дисулфидни врски. Неодамна беше откриено дека циркулирачкиот хепцидин со релативно висок афинитет е врзан за $\alpha 2$ -макроглобулин и со релативно низок афинитет со албуминот. Во прилог на својата улога во регулирањето на системскиот метаболизам на железо, хепцидинот може да придонесе за одбраната на домаќинот. Хепцидинот првично беше идентификуван како антимикуробен пептид и беше откриено дека може индиректно да придонесе за одбраната на домаќинот преку намалување на концентрацијата на железо во плазмата.

Contemporary Views of Iron Homeostasis with Main Focus of Heparin - New Hormone Regulator of Iron Metabolism

Biljana Ilkova^{1*}, Bisera Kotevska², Georgi Trifunov²

¹PHO Clinical hospital Dr. Trifun Panovsky, Bitola, Republic of Macedonia; ²Tokuda Hospital, Sofia, Bulgaria

Abstract

Citation: Ilkova B, Kotevska B, Trifunov G. [Contemporary Views of Iron Homeostasis with Main Focus of Heparin - New Hormone Regulator of Iron Metabolism]. Maced Med Electr J. 2015 Aug 12; 2015;50010. [Macedonian] <http://dx.doi.org/10.3889/mmej.2015.50010>

Key words: iron; ferritin; transferrin; heparin.

Correspondence: Dr. Biljana Ilkova, St. Dimce Lahcanski No 29, 7000 Bitola, Republic of Macedonia. Tel: +389-71-361-262. E-mail: drbiljanailkovska@yahoo.com

Received: 07-Jul-2015; **Revised:** 30-Jul-2015; **Accepted:** 31-Jul-2015; **Published:** 12-Aug-2015

Copyright: © 2015 Biljana Ilkova, Bisera Kotevska, Georgi Trifunov. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Iron is an essential element of almost all living organisms. It is key functional part of oxygen transporters, depository molecules and many enzymes which catalyze redox reactions necessary to generate the energy, products of various metabolic intermediates and defense. Studies have shown that a key regulator of iron homeostasis is heparin and set the liver as the central authority in the system of iron homeostasis. Heparin is cationic peptide composed of 25 amino acids and four disulfide bonds. Recently it was revealed that circulating heparin with a relatively high affinity is bound to $\alpha 2$ -macroglobulin and with relatively low affinity is bound to albumin. In addition to its role in regulation systemic metabolism of iron, heparinot can contribute to host defense. Heparinot was originally identified as an antimicrobial peptide and found that it could indirectly contribute to host defense by reducing the concentration of iron in plasma.

Вовед

Микроелементите се хемиски елементи, коишто се содржат во организмите во илјадити делови од процентот (железо, бакар, цинк, молибден, бром, флуор, јод и др). Тие се неопходни за нормалната животна функција. Влегуваат во составот на ензими, витамини и хормони. Влијаат врз растот, размножувањето и образувањето на крвта. Нивниот недостаток или вишок води до нарушен метаболизам на материите.

Железото е есенцијален елемент за скоро сите живи организми [1]. Тој е клучен функционален дел на кислородните транспортери и депонирачките молекули (пр. хемоглобин, миоглобин) и многу ензими кои ја катализираат редуктивната реакција неопходна за создавање на енергија (пр. цитохромите), продукти на различни метаболички интермедиери и за одбрана (никотин амид динуклеотин фосфат оксидаза [NADPH] [2].

Историја на железо

Од античко време, човекот ја препознал посебната улога на железото во здравјето и болестите [3]. Железото имало рана употреба во медицината на Египјаните, Хундите, Грците и Романците [4, 5].

За време на 17^{ти} век, железото се користело за лекување на хлороза (зелена болест), состојба која настанувала од недостаток на железо [6]. Веќе во 1930 год. McCance и Widdowson ја предвидуваат цревната апсорпција на железо со одземање на концентрацијата на железо од изметот и урината од внесената концентрација на железо преку храната. Тие истакнале дека апсорпцијата на железо е зголемена кај лица со недостаток на железо.

Hahn и Whipple ја анализирале кинетиката на цревната радиоактивно обележена железна апсорпција и користењето на човечки и анимални модели и потврдиле дека апсорпцијата е регулирана и нема значајно излучување на железо. Во 1932 год. беше откриена важноста на железото со убедливи докази дека неорганското железо е потребно за синтеза на хемоглобинот [7, 8]. Во 1950 год. Finch и Saylor докажуваат дека апсорпцијата на железо се стимулира од зголемана еритропоетинска активност, а се потиснува од хипертрансфузија.

Рециклирање на хемоглобин (од оштетени еритроцити обележани со радиоактивно железо) во железо беше измерено од Noyes, Bothwell и Finch. Тие открија дека повеќе железо се ослободува од ретикулоендотелниот систем кај

пациенти или експерименталните модели на животни кои имаат недостаток на железо, што покажува дека ослободувањето на железо од макрофагите е регулирано од резервите на железо.

Freireich, Wintrobe, Cartright, Finch и други покажаа дека воспалението поттикнува секвестрација на железо во макрофагите од хепар и слезина (ретикуло ендотелен систем) и го инхибираат снабдувањето со железо на еритропоезата, предизвикувајќи анемија. Beutler и сор. очекуваа во 1960 год. дека хуморални супстанции учествуваат во апсорпцијата на железо според потребите од железо на еритропоезата но Krantz и сор. докажаа дека оваа супстанција не е еритропоетин.

Во 1960 год. Manis, Schachter, Wheby и сор. покажаа во изолирани цревни петелки дека апсорпцијата на железо се одвива во проксималниот дел од дванаесетпалачно црево и се регулира во 2 етапи: навлегување на железо во ентероцитите (мукозно навлегување), потоа следи складирање на железо во форма на феритин во цитоплазмата или ослободување на железо во циркулацијата (мукозен трансфер). Бидејќи животниот век на ентероцитите е неколку дена, судбината на железото од исхраната кое е преземено од ентероцитите ќе биде утврдена од страна на базолатералниот транспорт на железо: или апсорпцијата на железо ќе дозволи влез во крвотокот или ќе биде вратено во цревниот лумен со смрт на ентероцитите и исфрлање преку изметот.

Во 1970 год. истражувачите ја преиспитале патогенезата на наследната хемохроматоза (НН), синдром при кој вишокот на железо се натрупува во црниот дроб и други ткива, резултирајќи со оштетување на ткивата, нарушена функција на органите и црнодробна карциногенеза [9]. Во 1990 год. имаше ренесанса на патологијата на железо. Испитувањата на пациенти и животински модели со генетски нарушувања на железо доведе до идентифицирање на гени кои се одговорни за транспортот на железо, оксидоредуктази поврзани со транспортот и железо регулаторни молекули [10].

Историја на феритин

Феритинот беше откриен во 1937 год. од францускиот научник Laufberger, кој изолира нов протеин од слезинка на коњ, која содржела околу 23% од сувата тежина, железо [11]. Присуството на феритин во човечки серум е документирано неколку години подоцна [12].

Во 1972 год. со користење на имунорадиометриски методи, Addison и сор.

уверливо демонстрираа дека феритинот може сигурно да се открие во човечки серум [13]. За да се открие поврзаноста помеѓу серумските нивоа на феритин и тоталните резерви на железо во организмот, авторите ја измериле концентрацијата на феритин во серумот кај здрави лица, кај пациенти со недостаток на железо и кај пациенти со вишок на железо. Тие докажале дека серумскиот феритин е покачен кај пациенти со вишок на железо и намален кај пациенти кои имаат недостаток на железо [14]

Во 1975 год. Jacobs и Worwood сугерираат дека методата на определување на феритин во серумот може да обезбеди "корисна и конвенционална" метода за определување на статусот на резервите на железо [15].

Историја на хепцидин

За прв пат за поврзаноста помеѓу хепцидинот и метаболизмот на железо говорат Pigeon и сор. во студијата за одговорот на црниот дроб на оптеретувањето со железо. Тие откриле mRNA на глвчешки хепцидин со субтракциска хибридизација при преоптеретување со железо наспроти нормалните глвци и покажаа дека mRNA е доминантно експресирана во хепатоцитите.

Во 2001, обсервациите на зголемена експресија на хепцидин во одговор на вишок на железо во храната водат до хипотезата дека хепцидинот може да делува како централен регулатор на хомеостазата за железо [16]. За време на истражувањето на антимикробните својства на различни човечки течности, Park и сор. изолирале нов пептид богат со цистеин од човечка урина и го именувале како хепцидин заради неговото црнодробно потекло и антибактериските ефекти (името произлегува од неговата синтеза (во црн дроб, hep-) и антимикробните својства in vitro (-cidin)) [17].

Независно, Krause и сор. трагајќи за пептид богат со цистеин со антибактериски карактеристики, во 2000 год. изолирале ист пептид како Park и сор. од ултрафилтрат на плазма и го именувале како антибактериски пептид кој се синтетизира во црн дроб (анг. liver expressed antimicrobial peptide-1, LEAP-1) [18].

Дневни потреби на железо

Возрастен организам, просечно има 3-5 g железо (~ 45 mg/kg жена, ~ 55 mg/kg за мажи). Погolem дел од железото во организмот е вградено во хемоглобинот на циркулирачките

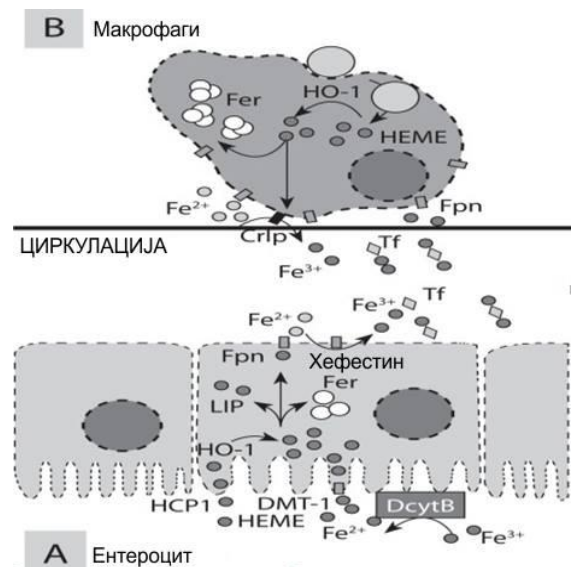
еритроцити (60-70%). Околу 20 - 30% железо е во форма на феритин и хемосидерин во хепатоцитите и PЕС макрофагите, како резервно железо. Додека возрастен маж има 0.5-0.2 g складирано железо, децата, адолесцентите и жените во репродуктивниот возраст речиси немаат резерви на железо. Една мала количина, од преостанато железо во телото, е во форма на миоглобин во мускулите или инкорпорирано во ензими [19]. Околу 1-2 mg од железото се губи секој ден преку: кожата, со десквамација на цревата и минимални крвозагуби [20].

Дистрибуција на железо

Апсорпција на железо во тенкото црево

Железото во храната е присутно во две форми – како неорганско или нехем железо и хем железо. Неорганското железо е доминантно во секојдневната исхрана (~90%), додека пак органското (~10%) од вкупната количина на железо во нашата исхрана. Хем железото потекнува од хемоглобинот, миоглобинот и други хем протеини во храната од животинско потекло.

Апсорпцијата на железо се одвива во дуоденум и горните делови на јејунум. Процесот вклучува протеини кои го транспортираат железото низ апикалната мембрана (импортери), протеини кои го транспортираат низ базолатералната мембрана (експортери) и протеини кои ја менуваат неговата редуктивна состојбата, па се вклучени во неговиот транспорт [21] (Слика 1).



Слика 1: Апсорпција и транспорт на железото низ ентероцитите: фериредуктаза; транспортер за двовалентен метал-1 (DMT-1); протеин за транспорт на хем-1 (HCP1); хем оксигеназа (HO-1); изнесувач на железо - феропортин; хефестин; рецептор за трансферин -1 (TfR1) [22]

Апсорпција на неорганско железо

Најголем дел од нехем железото од храната пристигнува до трепчестиот епител во фери форма (Fe^{3+}). Во дуоденум под дејство на фериредуктаза, дуоденален цитохром В (DcytB) ензим, железото се редуцира во феро форма (Fe^{2+}). Аскорбатот (витамин Ц), е коензим на ензимите вклучени во редукцијата на фери форма (Fe^{3+}) во феро (Fe^{2+}) [23].

Железото се транспортира низ апикалната мембрана во цитоплазмата на дуоденалните ентероцити со посредство на транспортерот за двовалентен метал-1 (Divalent metal transporter-1 DMT1) (слика 1-A). DMT1 не е специфичен само за транспорт на железо, тој исто така транспортира и други двовалентни метали вклучувајќи цинк, магнезиум и бакар [1, 24]. Овој транспортен протеин се наоѓа и на мембраната на ендозомите каде што посредува при транспортот на железо од ендозомите во цитоплазмата за време на трансферинскиот циклус [25]. DMT-1 се чини дека има важна улога во транспортот на железото кое не е врзано за трансферинот (NTBI), особено при вишок на железо [26].

Некои истражувања покажале дека транспортот на железо низ дуоденумот се врши со посебен, досега недоволно откриен пат. Додека феро железото користи DMT-1, фери железото користи интегрин-мобилферински пат (IMT) кој транспортира исклучиво фери железо [27]. Овој пат вклучува неколку протеини: мобилферин, бета-3-интегрин и флавин-монооксигеназа. Флавин-монооксигеназата има улога на фериредуктаза. Во цитоплазмата на клетката овие протеини се интегрирани во голем протеински комплекс наречен параферитин [28]. Western Blott анализа на параферитин покажа дека тој содржи и бета-2-микроглобулин и DMT-1. Присуството на DMT-1, мобилферитин и хефестин во цитоплазмата на клетките укажува на можната интраклеточна функција на овие протеини (29) [29].

Апсорпција на хем железо

На култивирани клетки, експериментално е покажано дека интактниот хем, низ апикалната мембрана на ентероцитите се апсорбира со протеински носач на хем-1 (Heme-carrier protein 1, HCP1) (слика 1-A). HCP1 е транспортен протеин кој во големи количини е присутен во дванаесет-палачно црево [30, 31]. Последните истражувања посочуваат дека овој протеин можеби има улога на транспортер и на фолати [32].

Интраклеточен транспорт на железо

Дел од железото, внесено во интестиналните епителни клетки преку апикалната мембрана

се вградува во феритинот или се транспортира во циркулацијата минувајќи низ базолателарната мембрана [33].

Железото задржано во феритинот се губи со десквамација на старите мукозни клетки – процес кој се одвива на 3 - 4 дена, колку што е животниот век на мукозните клетки. Другиот дел од железото, преку базолателарната мембрана со помош на феропортинот (експортер), се транспортира во циркулацијата. Според тоа феропортинот, одредува дали железото ќе се испорача во циркулација или ќе се отстрани од организмот со десквамација [21].

Транспортот на железото низ цитоплазмата на ентероцитите е сеуште неразјаснет дел од процесот на апсорпција на железото; се смета дека постојат два механизми: транспорт потпомогнат со некои протеини, шаперони или со трансцитоза [34].

Феропортинот е единствен, сега за сега, познат експортер на железото [35] (слика 1-A). Феропортинот се среќава во сите ткива кои изнесуваат железо во плазмата: базолателарната мембрана на ентероцитите во дуоденумот, мембраните на ретикулоендотелните макрофаги (вклучени во складирање и рециклирање на железото), хепатоцитите, клетките на плацентата [36].

Слично како кај апикалната апсорпција на железо, базолателарното изнесување на железото е потпомогнато од ензим, кој ја менува оксидативната состојба на железото. Во овој случај, феро (Fe^{2+}) железото, кое ја напушта клетката мора да биде оксидирано во фери форма (Fe^{3+}) за да се врзе со трансферинот. Оваа оксидација, во дуоденумот, ја врши хефестинот, а кај сите останати клетки во организмот, церулоплазминот (слика 1-A) [37].

Транспорт на железо во плазмата

Во плазмата, железото се транспортира со трансферинот. Се смета дека околу 20 mg железо, секојдневно се пренесува со трансферинот [38]. Трансферинот е железо - врзувачки гликопротеин, со молекулска тежина од приближно 80 kDa [39]. Генот за трансферин е лоциран на хромозом 3q21 блиску до гените за лактоферин и церулоплазмин. Трансферинот се синтезира во хепатоцитите [40]. Само фери формата (Fe^{3+}) има способност да се врзе со трансферинот. Трансферинот е завиткан во форма на два глобуларни домени; секој од домените содржи по едно специфично место за врзување на еден атом на тровалентно железо (Fe^{3+}). При физиолошки pH, трансферинот има многу висок афинитет за железото, па скоро целото нехем железо во циркулацијата е врзано за трансферинот. Утврдено е дека со намалување на pH, се намалува и афинитетот на железото за

трансферинот, така да при рН под 4.5 не можеле да се детектираат мерливи врзани количини на железо за трансферинот [41].

Трансферинот го испорачува железото во клетките со процес на ендоцитоза посредувана со трансферинот во т.н. трансферински циклус. При физиолошки услови, овој циклус овозможува контролиран пристап на железото во клетките бидејќи поедините клетките ефикасно можат да го регулираат влезот на железото преку регулација на експресијата на трансферински рецептор-1 на површината, врз основа на нивните потреби за железото [21].

До денес, се опишани два типа на функционални различни рецептори за трансферин: трансферин рецептор 1 и 2 (TfR1 и TfR2). Најдено е дека TfR1 се наоѓа на површината на сите клетки кои имаат потреба од железото, но нивото на неговата експресија се разликува во огромна мерка од типот на клетките [42].

TfR1 претставува трансмембрански гликопротеин, со молекуларна маса ~180 kDa, изграден од две идентични субединици поврзани со дисулфиден мост. Секоја субединица има по едно место за врзување на трансферин [21].

Експериментално на култура од клетки е утврдено дека TfR2, воглавно е присутен во црн дроб, хематопоетски клетки и дуоденалните криптогени клетки [43].

Депоза на железо во организмот

Железото се складира во црниот дроб во хепатоцитите и Купферовите клетки во две форми: феритин и хемосидерин [21].

Во клетките, феритинот, има двојна улога - како депо за железото и како молекула за детосикација на клетките од вишокот на железо и на тој начин ги штити од тосичното дејство на вишокот на железо [44].

Феритинот е изграден од 24 субединици, организирани така да има изглед на шуплива школка, во која се складираат приближно 4500 Fe³⁺ атоми како неоргански комплекс. Феритинот изолиран од рбетниците е изграден од два типа на субединици: H (heavy - тешки или heart – срце) и L (light – лесни или liver – црн дроб). Количинскиот сооднос меѓу двата типа на субединици се разликува од ткиво до ткиво. Вградувањето на железото во феритинот, бара ферооксидативна активност која се препишува на H-субединиците, додека пак L-субединиците учествуваат во минерализацијата [45].

Железото, депонирано во феритинот, може да се користи кога ќе се намали неговото ниво во клетката. Сеуште не е докрај разјаснет механизмот според кој железото се ослободува од

феритинот [46].

Иако, главно феритинот се наоѓа во цитоплазмата на клетката, мала фракција е најдена и во јадрото на некои клетки. Се смета дека феритинот во јадрото го испорачува железото потребно за ензимите кои зависат од присуството на овој метал или за факторите за транскрипција [47].

Најновите истражувања покажале дека феритинот е присутен и во митохондриите (MtF). Митохондриите се органели кои имаат висок обрт на железото потребен за биосинтеза на хем и ензими кои содржат Fe-S групи. И митохондријалниот недостаток на железо и вишокот на железо ја нарушуваат метаболната и респираторната активност на митохондриите, затоа хомеостазата на железо во овие органели мора да биде строго контролирана. Се претпоставува дека феритинот има важна улога во депонирањето на железо, заштитувајќи ги митохондриите од оксидативен стрес [48].

MtF се наоѓа во исклучително ниски количини во повеќето клетки. Студиите покажале дека зголеменото присуство на MtF значително влијае врз интрацелуларната хомеостаза на железо и води до брза прераспределба на железо од цитоплазмата во митохондриите, каде што се депонира во форма која не е достапна за метаболичка употреба [49, 50].

Друга форма на складирано железо во клетката е хемосидерин, нерастворлив деградационен производ од нецелосна деградација на феритинот во лизозомите. При преоптоварување со железо, хемосидеринот станува протеин во кој доминантно се складира железо. Во физиолошки услови хемосидеринот не е ефективен донатор на железо, но има заштитна улога. При воспаление и хипоксија тој може да стане донатор на железо и да придонесе за создавање на слободни радикали и оштетување на ткивата и клетките кои се преоптеретени со железо [51].

Регулација на системската хомеостаза на железо

Коскената срцевина е основниот потрошувач на железото од циркулацијата и најголем дел од дневните потреби за железо се користат за синтеза на хемоглобинот во 200 милјарди нови еритроцити. За рамнотежа, макрофагите рециклираат 10–20 пати повеќе железо од железото кое се апсорбира во цревата (кое се користи за задоволување на дневните потреби од железо). Макрофагите од RES во слезината и другите органи ги фагоцитираат и лизираат старите и оштетени еритроцити. Хем оксигеназата (HO-1) го разградува хемот, се ослободува железото од протопорфириносинтезата и со

помош на феропортин се враќа во плазмата и се врзува за трансферинот (Слика 1-Б) [52, 53].

Дневно, човековиот организам губи околу 1-2 mg железо и исто толку количество на железо се ресорбира во тенкото црево, за да се обезбеди доволно, но не и премногу железо, за да бидат полни резервите на железо. Според тоа, системската хомеостаза на железо ја регулира цревната апсорпција на железото, неговото навлегување и мобилизирање од депоата се со цел да се задоволат потребите на еритропоезата. Таа, исто така обезбедува стабилна средина каде што секоја клетка го регулира навлегувањето на железото во зависност од сопствените потреби.

Истражувањата покажаа дека клучен регулатор во хомеостазата на железото е хепцидинот. И го поставија црниот дроб за централен орган во системската хомеостаза на железото [54, 55].

Хепцидин

Хепцидинот е негативен хормонски регулатор на метаболизмот на железо. Генот за хепцидин (HAMP; OMIM 606464), е лоциран на хромозом 19q13.1 [56].

Човечкиот хепцидин доминантно се синтетизира во црниот дроб како 25 аминокиселински пептид (2789.4 Da) кој се секретира во циркулацијата [16, 18]. Хепцидинот се синтетизира како пре-пропептид составен од 84 аминокиселини. Со ензимско каталитичко отцепување, пре-пропептидот поминува во прохепцидин изграден од 64 аминокиселини. Зрелиот, активен, 25-аминокиселински хормон хепцидин, најверојатно се добива со отцепување на прорегионот (n = 39 аминокиселини) под дејство на пропротеин конвертазата, фурин [57].

Во плазмата, исто така, циркулира и како 20 и 22-аминокиселински пептид и како прохепцидин кој нема хормонско дејство [58].

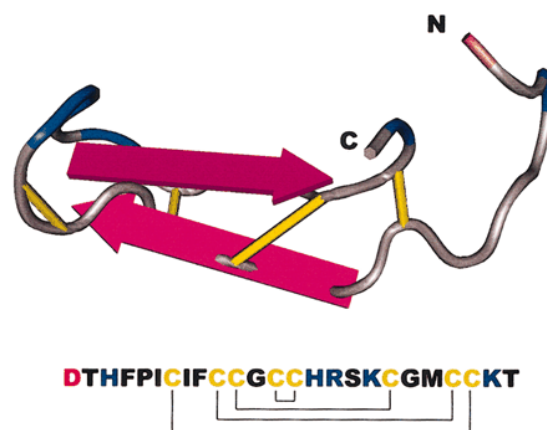
Последните студии укажуваат на експресија на хепцидин и во други клетки, покрај хепатоцитите, иако во многу мали количини. Тие вклучуваат: срце, ретина, моноцити, неутрофили, масни клетки, алвеоли, панкреасни клетки и миокардни клетки [59-65]. Синтезата на хепцидин од овие клетки, неможе да направи сигнификантно значење во концентрацијата на системската циркулација, но може да има локален ефект во тие ткива. Преку автокринна интеракција со феропортинот, хепцидинот локално може да ги заштити околните клетки од недостаток на железо, превенира екстрацелуларен оксидативен стрес, влијае на инфламаторниот одговор и/или ги

осиромашува екстрацелуларните резарви на железо кои се достапни за екстрацелуларните патогени [65-68].

Структура на хепцидинот

Со нуклеарно магнетна резонансна спектроскопија е утврдено дека хепцидинот има структура која личи на шнола, стабилизирана со 4 дисулфидни мостови [69].

Хепцидинот е катјонски пептид составен од 25 аминокиселини и 4 дисулфидни врски. Hunter и сор., ја анализирале синтетската форма со нуклеарно магнетна резонантна спектрометрија и ги потврдија неговите врски и структура (слика 2).



Слика 2: Аминокиселински секвенци во модел на човечки хепцидин. Амино и карбокси краевите се именувани N и C. Дисулфидните врски се во жолто, базните аминокиселини се во сино и киселините аминокиселини се во црвено. Моделот на дисулфидните врски помеѓу 8-те цистеина е покажан на аминокиселинските секвенци [79]

Тесно поврзани гени за хепцидин, исто така, се пронајдени кај стаорци и неколку видови на риби [17] (слика 3). Глувчешкиот геном содржи два гена за хепцидин, но се смета дека само еден хепцидин има улога во метаболизмот на железото [70].

hHEP	DTHFPICIFCCGCCRKAI CGMCCCKT
pHEP	DTHFPICIFCCGCCRKAI CGMCCCKT
rHEP	DTNFPICLFCCKCCKNSSCGLCCKIT
mHEP	DTNFPICIFCCCKCCNNSQCGICCKT
dHEP	DTHFPICIFCCGCCRKAI PKCGLCCCKT
zHEP	QSHLSLCRFCCCKCCRNKGCYCKF

Слика 3: Секвенци на хепцидин кај вертебрати: човек (hHEP), прасе (pHEP), зајак (rHEP), глушец (mHEP) и куче (dHEP). Хепцид кај риба зера (zHEP) [71]

Анализа на секвенците на хепцидин (DTHFPICIFCCGCCRKAI CGMCCCKT) откриваат

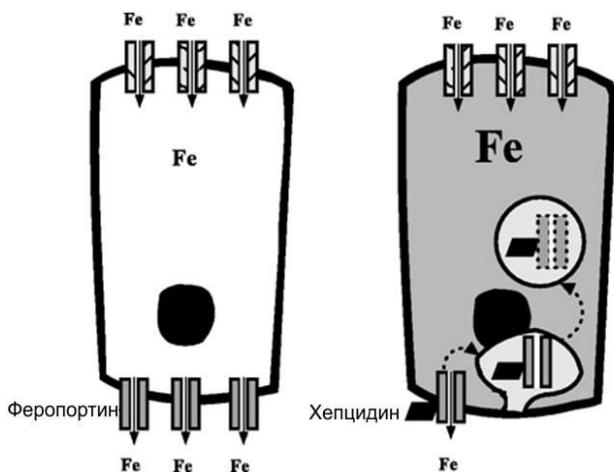
голем процент на цистеин – 8 цистеина [69]. Ова е необично висока содржина на цистеин, кога се споредува со други антимицробни пептиди богати со цистеин, слично на дефензин [72], тахиплезин [73], протегрин [74] и снакин [75]. Со масена спектроскопија и хемиска анализа е откриено дека сите цистеини се поврзани во секвенци, со што овој пептид е мошне ограничени пептид [76].

На кружна спектрометрија со дихроизам на човечки уринарен хепцидин се покажа дека тој е богат со β -вериги и NMR потврди дека хепцидинот претставува едноставна цефка стабилизирана со три дисулфидни врски и соседна дисулфидна врска на кривината [69].

Функција на хепцидинот

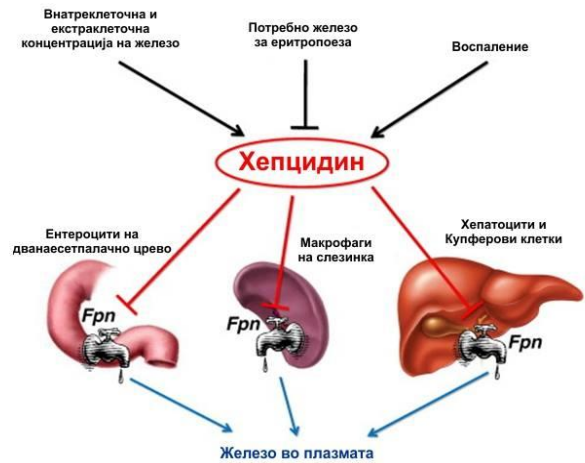
Хепцидин-25 се претпоставува дека е главен регулатор на апсорпцијата на железо со храната и клеточното ослободување на железо. Хепцидинот игра клучна улога во хомеостазата на железото. Тој го регулира депонирањето и преземањето на железото преку врзување за феропортинот-експортер на железото. Хепцидинот предизвикува внесување на феропортинот во клетката каде што тој, феропортинот, се разградува и на тој начин го спречува излегувањето на железото од клетките во кој е депонирано [36].

Преку овој механизам, хепцидинот ја инхибира: (1) апсорпцијата на железото во тенкото црево (слика 2), (2) отпуштањето на железото од неговото депо во хепатоцитите и (3) отпуштањето на железото од макрофагите вклучени во рециклирање на остарените клетки [57].



Слика 4: Хепцидинот ја регулира синтезата на феропортин на базолатерална мембрана на ентероцитите

Преку сите горенаведени дејствија, хепцидинот го контролира нивото на железото во крвта (слика 4).



Слика 5: Хепцидинот има централна улога во одржување на хомеостазата на железо

Во прилог на својата улога во регулирањето на системскиот метаболизам на железо, хепцидинот може да придонесе за одбраната на домаќинот. Хепцидинот првично беше идентификуван како антимицробен пептид [17, 18]. Иако *in vitro* студиите укажуваат бактерициден ефекти на хепцидин, овие ефекти бараат концентрации повисоки од оние забележани во циркулацијата. Таквите концентрации може да се постигне на локално ниво, на пример, во фагозоми на инфицираните макрофаги [77].

Хепцидинот исто така, може индиректно да придонесе за одбраната на домаќинот преку намалување на концентрацијата на железо во плазмата. Железото е неопходно за микробен раст, исто така намалување на железото во плазмата делува бактериостатски. Покрај тоа, беше пронајден хепцидин за моделирање на липополсахаридно индуцирана транскрипција и во култивирани макрофаги и *in vivo* во глувчешки модел. Последново набљудување укажува на улогата на хепцидин во модулирање на акутен воспалителен одговор на бактериска инфекција [78].

Регулација на синтезата на хепцидин

Синтезата на хепцидин е регулирана од физиолошки и патолошки процеси. Концентрацијата на хепцидин се намалува во ситуации кои бараат зголемена концентрација на циркулирачко железо. Синтеза на генот за хепцидин е регулиран на транскрипциско ниво [79].

До денес се откриени два главни патишта од клеточна сигнализација кои се вклучени во транскрипцијата на хепцидин.

1. Првиот пат е поврзан со активација на цитоплазматскиот протеин за транскрипција Stat3

(сигнален трансдјусер и активатор на транскрипција). После активирање, овој протеин се пренесува во јадрото каде што активира транскрипција на генот за хепцидин, врзувајќи се со адекватен сегмент на DNA [80].

2. Втор механизам на контролата на транскрипција на хепцидин (сигнален пат зависен од BMP/Smad) вклучува Smad протеини (нивното име е комбинација од името на два хомологни протеини Sma и MAD) и коскен морфоген протеин (BMPs). BMPs се плеотропни сигнални молекули од фамилијата на растечки фактори [80]. BMP - сигнализирачки пат се иницијализира по врзување на BMP со BMP рецепторскиот комплекс на површината на клетката, кој ја активира рецепторната киназа за да ги фосфорилира цитоплазматските протеини SMAD1, SMAD5 и SMAD8. Овие фосфорилирани, рецепторски-регулирани SMADs, формираат комплекс со SMAD4, кој се состои од рецепторски-регулиран SMADs и SMAD4, кои се пренесуваат во јадрото и индуцираат транскрипција на целиот ген како хепцидин [81, 82].

Во регулација на хепцидинот, се претпоставува дека се вклучени најмалку 4 одделни и различни патишта:

- 1) регулација со статусот на железото, железото од храната и депонираното железо;
- 2) регулација со процес на воспаление;
- 3) регулација со хипоксија/аноксија; и
- 4) регулација со еритроидните фактори [83,84].

Регулација со статусот на железото (четири хипотези слични, но различни)

Во случај на зголемена еритропоеза, како на пример во одговор на недостаток на железо, намалена концентрација на хепцидин ќе резултира со ослободување на депонирано железо и со зголемена апсорпција на железо од храната [85-88].

Резервите на железо во црниот дроб и циркулирачкиот трансферин врзан за железо (Tf-Fe₂) даваат различни сигнали за синтеза на хепцидин од хепатоцитите на глувчешки модели [89-91]. Циркулаторниот трансферин се чини дека е во хепатоцелуларен комплекс, кој вклучува трансферински рецептор-1 (TfR1) трансферински рецептор-2 (TfR2) и хемокроматозен железен протеин (HFE). Дефекти во TfR2 и HFE водат до намалена концентрација на хепцидин со екстраклеточна сигнално-регулаторна киназа: митогенски активиран протеин киназен пат (ERK/MAPK) и/или коскен морфоген протеин/против мајчин декапентаплегичен хомологен пат (Drosophila) (BMP/SMAD).

Интраклеточните резерви на железо преку BMPs се во комуникација со хепцидинот, на паракрин или автокрин начин. Овие екстраклеточни сигнални молекули делуваат на хепатоцелуларниот BMP рецептор за активација на интраклеточниот SMAD сигнален пат и ја зголемуваат транскрипцијата на хепцидин. Хемојувалинот (HJV) и BMP корецепторот [92], се основни за синтеза на хепцидин бидејќи различни хепцидин регулаторни патишта се во конверзија со протеините врзани за мембраната. Во случаи на ниско железо, мембрански врзаниот HJV се расцепува од матриптаза-2, трансмембрански протеазен серин 6 [93, 94]. Ова одвојување од матриптаза-2 ја ослабнува BMP сигнализацијата.

Регулацијата на хепцидин при оптеретување со железо е посредувана од коскен морфогенетски протеински (BMP) рецепторен комплекс врз површината на хепатоцитите [92, 95, 96]. Овој комплекс се состои од два протеини: HFE и хемојувалин. Иако точните молекуларни механизми се уште не се целосно разјаснети, овој коскен морфогенетски протеински (BMP) рецепторен – комплекс, се поврзува со трансферински рецептори 1 и 2, најверојатно поврзувајќи ја чувствителноста за серумското железо со синтезата на хепцидин [97, 98].

Основниот механизам со кој железото стимулира синтеза на хепцидин е со активација на BMP6-HJV-SMAD сигнален пат. BMP6-SMAD сигналниот пат во црниот дроб се активира од железо и способноста на железото да стимулира синтеза на хепцидин зависи од BMP6-SMAD сигнали. Механизмот со кој нивото на железо води до зголемени BMP6-HJV-SMAD сигнали, сеуште не е добро разјаснет. Беше откриено дека HFE, TFR2 и трансферин рецептор-1 (TFR1) може да се вклучени во овој процес [97, 99].

Регулација со еритроидните фактори (две хипотези слични, но различни)

Беше откриено дека аплицирање на агенци стимулатори на еритропоезата (ESA) ја намалуваат хепатоцитната синтеза на хепцидин кај глувци, луѓе и in vitro студии [100-103]. Еритропоезата бара значителни количини на железо, затоа намалена синтеза на хепцидин во црниот дроб од еритропоетските сигнали е од голема физиолошка важност. Сепак, сеуште не е јасно како еритропоезата го регулира хепцидинот. Хипотезата дека еритропоетинот (EPO) делува директно врз хепатоцитните рецептори во клеточни култури [101] не можеше да биде потврдено кај животински модели за анемија, што покажа дека намалена синтеза на хепцидин зависна од еритропоезата не е директно медирана од EPO [88,103]. Веројатно дополнителни еритропоетски фактори ја регулираат синтеза на хепцидин и истите допрва треба да бидат

откриени.

Регулацијата на производството на хепцидин од страна на еритропоезата останува слабо разбрана. Еден или повеќе неидентификувани сигнали од коскената срцевина, генерирани во текот на зголемена еритропоеза, водат до намалено произведување на хепцидин [88, 103]. Зголемената потреба од вградување на железо во хемоглобинот е посредувана со зголемена цревна апсорпција на железо и ослободување на депонираното железо во ретикулоендотелниот систем. Овој механизам на сигнална трансдукција, се чини многу стабилен и способен е да го задржи нивото на хепцидин многу ниско, дури и при состојби на системско преоптеретување со железо како што има при таласемија [104]. Во оваа конкретна подгрупа на пациенти, раст на факторот 15 на диференцијација, се смета како сигнал на коскена срцевина кој предизвикува супресија на хепцидинот [105].

Регулација со хипоксија (неколку хипотези слични, но различни)

Во случај на зголемена еритропоеза, како на пример во одговор на хипоксија, намалена концентрација на хепцидин ќе резултира со ослободување на депонирано железо и со зголемена апсорпција на железо со храната [85-88].

Намалена синтеза на хепцидин беше откриена во одговор на хипоксија *in vivo* [85, 106]. Овој ефект може да се должи на ефектот на хипоксија, на EPO експресија, на еритропоетска активност и/или евентуално директна интеракција со хепатоцитните рецептори.

Намалена синтеза на хепцидин при хипоксија може да биде препишана на хепар-специфична стабилизација од фактор кој индуцира хипоксија (HIF)-1 [107] со ефект врз BMP/SMAD сигналниот пат [108, 109]. Дали HIFs директно се врзува со хепцидинскиот промотор во моментот сеуште е контроверзно. Сепак, постојат индиректни механизми со кои HIFs може да ја регулира синтеза на хепцидин. Зголемена активност на HIF е поврзана со зголемено расцепување на хемојувелинот медирано од матриптаза, а со тоа и намалена синтеза на хепцидин [109].

Хипоксијата е потенцијален инхибитор на синтеза на хепцидин дури и при отсуство на анемија. Механизмите не се комплетно разјаснети, но се смета дека се поврзани со фактор кој индуцира хипоксија HIFs. HIFs се хетеродимерни транскрипциони фактори кои содржат алфа регулаторна субединица (HIF-1 α , HIF-2 α , or HIF-3 α) и бета субединица која се експресира на повеќе места (HIF-1 β , исто така позната како ARNT).

При нормоксични состојби, со нормална концентрација на железо, HIF- α субединицата хидроксилира од кислородот и железо зависниот 2-оксоглутарат зависна оксигеназа, застапена како Hippel-Lindau (VHL) протеин и се разградува.

При хипоксија или состојби со недостиг на железо, хидроксилазната активност се инхибира во HIF- α субединица, транслоцирајќи се во јадрото, хетеродимеризирајќи со ARNT, и врзувајќи се со промоторни елементи одговорни за хипооксија (HREs) од целни гени за да модулира транскрипција на гени [110].

Иако еден извештај сугерира дека HIF-1 α се врзува директно со HREs во хепцидинскиот промотор и врзувањето со HIF ја потиснува транскрипцијата на хепцидин [107], во други студии се потврдени спротивставени мислења [111,112].

Алтернативни патишта сугерирани од други студии вклучуваат други HIF-1 независни, 2-оксоглутарат-зависни патишта [112] или патишта кои вклучуваат реактивни кислородни видови [111].

Интересно, фурин кој ги расцепува HJV и TFR1 исто така се кодирани од HIF целни гени [113, 114]. HIF може да ја потисне синтезата на хепцидин индиректно со редукција на BMP-SMAD-медирана индукција на хепцидин и/или редуциран HFE/TFR2-посредувана хепцидинска индукција [113-115].

Регулација со воспаление

Воспалението предизвикува зголемена синтеза на хепцидин [85, 106, 118], резултирајќи со намалена достапност на циркулирачко железо, што се претпоставува дека претставува одбрамбен механизам на човечкиот организам кон екстраклеточните пролиферирачки патогени (кои се зависни од железо).

При хронични инфламаторни состојби (од низок степен), ова во крајна линија води до намалена достапност на железо за еритропоезата, наречена анемија на хроничната болест [119].

Воспалението и оптеретување со железо предизвикаат производство на хепцидин. Во случај на воспаление, примарниот медијатор е со зголемено ново на IL-6, што пак предизвикува врзувањето на сигналниот трансдјусер и активатор на транскрипција (STAT) 3 со промоторот на хепцидин, зголемувајќи ја неговата активност [120, 121].

Студии на луѓето со хронични инфекции и тешка воспалителна болест покажаа значително зголемување на нивото на хепцидин, што силно сугерира дека покачени нивоа на хепцидин играат клучна улога во анемија на воспаление и

ретикулоендотелна блокада [122].

Најдобро карактеризирано механизам е директна транскрипциска активација на црнодробната синтеза на хепцидин со интерлеукин 6 (IL-6) врзувајќи се со неговиот рецепторен комплекс кој содржи gp130 активирајќи ја Јанушовата киназа (JAK) и активаторот на транскрипција 3 (STAT3), кој се врзува за DNA во проксимален хепцидин промотор [122-124]

Други проинфламаторни цитокини како IL-1, исто така може да учествуваат во индукцијата на хепцидин ([125].

Индукцијата на хепцидин од IL-6 се чини дека бара непроменети BMP-SMAD сигнални патишта поради загуба на хепато-специфичен заеднички медијатор Smad4 [126], присуство на растворлив HJV [96] или присуство на мал молекулен инхибитор од BMP тип I рецептор киназа активност [127], сите нарушувачи на индукција на IL-6 синтеза на хепцидин. Поврзаноста на овие патишта се чини дека делумно влијае врз нивото на хепцидинскиот промотор, каде проксималниот BMP одговорен елемент и STAT3 врзувачки елемент се во близина, бидејќи мутација на BMP одговорниот елемент сериозно ја нарушува индукцијата на хепцидин од IL-6.

Многу скоро, втор механизам беше окарактеризиран со кој проинфламаторните цитокини и бактериски липополисахариди (LPS) можат да индуцираат синтеза на хепцидин. Проинфламаторните цитокини и бактериски липополисахариди (LPS) активираат стрес на ендоплазматски ретикулум (ER) и одговор на протеините, зголемена експресија на CREBH (циклична AMP одговор елемент – врзувачки протеин H), кој ја активира транскрипција на гените одговорни за акутна фаза во црниот дроб [128]. ER стрес исто води до зголемена синтеза на хепцидин со врзување со CREBH и трансактивација на хепцидинскиот промотор. ER стрес е сугерирано дека со транскрипција регулира синтеза на хепцидин со CCAAT/ врзувачки протеин (C/EBP) хомологен протеин (CHOP) и C/EBP α , иако ова неможе директно да се поврзи со воспаление [129].

Кинетика на хепцидином

Неодамна беше откриено дека циркулирачкиот хепцидин со релативно висок афинитет е врзан за α 2-макроглобулин и со релативно низок афинитет со албуминот. На база на теоретски пресметки, беше проценето дека 11% од хепцидинот слободно циркулира [130].

Екскрецијата на хепцидин се одвива преку бубрезите, што е докажано со наод на хепцидин – 20 и хепцидин – 22 формите, кои се скратени

изоформи на хепцидин–25, во урината [17].

Клиренсот на хепцидин се претпоставува дека се одвива: - преку клеточна разградба заедно со феропортинот на местата каде што дејствува и - со екскреција преку бубрезите.

Поради неговата ниска молекулска тежина и малиот радиус, неврзаниот хепцидин може слободно да помине низ гломерулскиот филтер. Во мали студии на луѓе, делумна екскреција на хепцидин била пресметана дека е помалку од 0%–5% [131, 132], дел поради неговата реасорпција, слично на други мали пептиди или поради тоа што не се филтрирал слободно.

Доказ за овие објаснувања се наодите на зголемена концентрација на хепцидин во серумот за 1 до 6 пати кај пациенти со гломерулска дисфункција [133-137] споредено со 20 до 30 пати зголемен β 2-микроглобулин во серумот. Екскрецијата на протеините со ниска молекулска тежина е речиси целосно регулирано од гломерулската филтрација. Можно е врзувањето со α 2-макроглобулин или друг врзувачки протеин да превенира циркулирачкиот хепцидин да биде слободно филтриран.

Во заклучок, постојат евидентни докази дека железото претставува есенцијален микроелемент за правилен раст и развој на сите клетки во човечкиот организам. Тоа е предизвик за многу научни работници и бројот на научни студии кои се поврзани со метаболизмот на железо е во постојан пораст.

Благодарност

Неизмерна благодарност до мојот ментор проф. д-р Даница Лабудовиќ за помошта која ми ја пружа при пишувањето на овој труд, кој е дел од мојата докторска дисертација.

Литература

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33: 940-959.
2. Tomas Ganz. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation *Blood.* 2003;102(3):783-8.
3. Beard JL, Dawson HD. Iron. In: O'Dell BL, Sunde RA, editors. *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements.* New York: CRC Press, 1997: pp. 275–334.
4. Wood RJ, Ronnenberg A, Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, *Modern Nutrition in Health And Disease.* 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. pp. 248–70.
5. McDowell LR. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science. *Minerals in Animal And Human Nutrition,* 2003: p. 660.

6. Guggenheim KY. Chlorosis: The rise and disappearance of a nutritional disease. *J Nutr.* 1995;125:1822–5.
7. Nazanin A, Richard H, Roya K. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19(2): 164–174.
8. Yip R, Dallman PR, Ziegler EE, Filer L. Present knowledge in nutrition. 7th ed. Washington DC: ILSI Press, 1996: pp. 278–92.
9. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 2011;117(17):4425–33.
10. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood.* 2008;112(2):219–230.
11. Laufberger V. Sur la cristallisation de la ferritine. *Bulletin de la Societe de chimie biologique.* 1937;19:1575–1582.
12. Worwood M. In: *Iron in Biochemistry and Medicine*, II. A.a.W. Jacobs M, editor. London: Academic Press, 1980: pp. 204–244.
13. Addison GM, Beamish MR, Hales CN, Hodgkins M, Jacobs A, Llewellyn P. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol.* 1972;25:326–329.
14. Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J.* 1972;4:206–208.
15. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N Engl J Med.* 1975;292:951–956.
16. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276: 7811–7819.
17. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001;276: 7806–7810.
18. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000;480: 147–150.
19. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;202:199–211.
20. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999;341: 1986–1995.
21. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochem Med.* 2012; 22(3): 311–328.
22. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update iron physiology. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(37): 4617–4626.
23. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001;291:1755–9.
24. Canonne-Hergaux F, Gruenhied S, Ponka P, et al. Cellular and subcellular localisation of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.* 1999; 93:4406–17.
25. Andrews, NC. Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6:181–6.
26. Garric MD, Singleton ST, Vargas F, et al. DMT1: Which metals does it transport? *Biol Res.* 2006; 39: 79–85.
27. Conrad ME, Umbreit EG, Moore LN, et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:767–74.
28. Umbreit JN, Conrad, ME, Hainsworth LN, et al. The ferrireductase paraferritin contains divalent metal transporter as well as mobilferrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:534–39.
29. Simovich MJ, Conrad ME, Umbreit JN, et al. Cellular localisation of proteins related to iron absorption and transport. *Am J Hematol.* 2002;69:164–70.
30. Latunde-Dada GO, Takeuchi K, Simpson RJ, McKie AT. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett* 2006;580:6865– 870.
31. Shayeghi, M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 2005;122:789–801.
32. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.* 2006;127:917–28.
33. Liu K, Kaffes AJ. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24:109–16.
34. Ma Y, Yeh M, Yeh K, et al. Iron Imports V: Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:417–22.
35. 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.
36. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004; 306: 2090–2093.
37. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem.* 1966;241(12):2746–51.
38. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:188–202.
39. MacGillivray RT, Mendez S, Sinha SK, et al. The complete amino acid sequence of human serum transferrin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79(8): 2504–2508.
40. Thorbecke GJ, Liem HH, Knight S, et al. Sites of formation of the serum proteins transferrin and hefnopexin. *J Clin Invest.* 1973; 52(3):725–731.
41. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:3579– 83.
42. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2137–43.
43. Rapisarda C, Puppi J, Hughes RD, et al. Transferrin receptor 2 is crucial for iron sensing in human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G778–83.
44. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:1647–58.
45. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1275(3):161–203.
46. Watt RK. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800:745–59
47. Alkhateeb A, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800:793–7.
48. Bou-Abdallah F, Santambrogio P, Levi S, et al. Unique iron binding and oxidation properties of human ferritin: A comparative analysis with human Hchain ferritin. *J Mol Biol.* 2005;347:543–54.
49. Nie GN, Chen G, Sheftel AD, et al. In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood.* 2006;108:2428–34.
50. Richardson DR, Lane HJR, Becker E, et al. Mitochondrial iron

- trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:10775-82.
51. Ozaki M, Awai T, Kawabata M. Iron release from haemosiderin and production of iron-catalysed hydroxyl radicals in vitro. *Biochem J*. 1988;250:589-95.
 52. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:1324-8.
 53. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:10919-24.
 54. Detivaud L, Nemeth E, Boudjema K, et al. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels and hepatic function. *Blood*. 2005;106:746-8.
 55. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implication for anemia of chronic disease. *Blood*. 2002;100:3776-81.
 56. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, et al. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. 2008;93(1):90-7.
 57. Valore E, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormon convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:132-38.
 58. Gagliardo B, Kubat N, Faye A, et al. Pro-hepcidin is unable to degrade iron exporter ferroportin unless matured by furin-dependent process. *J Hepatol*. 2009;50:394-401.
 59. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*. 2006;107:3727-32.
 60. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131:788-96.
 61. Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L417-25.
 62. Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology*. 2007;148: 2663-8.
 63. Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G, Cetin Y. Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinol*. 2008;197:241-9.
 64. Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Mysona BA, Roon P, Smith SB, Ganapathy V. Hepcidin expression in mouse retina and its regulation via lipopolysaccharide/Toll-like receptor-4 pathway independent of Hfe. *Biochem J*. 2008;411:79-88.
 65. Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, et al. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem*. 2010;21:749-56.
 66. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:2395-405.
 67. Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 2008;111:2392-9.
 68. Keel SB, Abkowitz JL. The microcytic red cell and the anemia of inflammation. *N Engl J Med*. 2009;361:1904-6.
 69. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, et al. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*. 2002; 277:37597-603.
 70. Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, Viatte L, Grimber G, Szajnert MF, Kahn A, and Vaulont S. Functional differences between хепцидин 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004;103: 2816-2821.
 71. Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G199-203.
 72. Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, Jr, Tack BF, Vogel HJ. The Solution Structures of the Human β -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002;277:8279-8289.
 73. Matsuzaki K, Nakayama M, Fukui M, Otaka A, Funakoshi S, Fujii N, Bessho K, Miyajima K. Role of disulfide linkages in tachyplesin-lipid interactions. *Biochemistry*. 1993; 32:11704-11710.
 74. Aumelas A, Mangoni M, Roumestand C, Chiche L, Despau E, Grassy G, Calas B, Chavanieu A. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem*. 1996;237(3):575-83.
 75. Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiol*. 2002; 128:951-961.
 76. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Adjacent cysteine residues as a redox switch. *J Biol Chem*. 2001; 276:7806-7810.
 77. Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS, Lafuse WP. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol*. 2007;82:934-45.
 78. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006;108(12):3730-3735.
 79. Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest*. 2007;117:1755-8.
 80. Justyna P, Ewa Z. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Prz Gastroenterol*. 2014; 9(4): 208-213.
 81. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-693.
 82. Zhao N, Zhang AS, Enns CA. Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest*. 2013;123(6):2337-43.
 83. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:207-14.
 84. Kemna EH, Kartikasari AE, van Tits LJ, et al. Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:339-46.
 85. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110(7):1037-1044.
 86. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and iron-loading anemias. *Haematologica*. 2006;91(6):727-732.
 87. Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):690-699.
 88. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression

- of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006;108(12):3730-3735.
89. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142:24–38.
 90. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*. 2011;53:1333–41.
 91. Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*. 2011;54:273–84.
 92. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006;38:531–9.
 93. Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood*. 2010;115:3817–26.
 94. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De D, I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008;8:502–11.
 95. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*. 2007; 110: 2182–2189.
 96. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007;117: 1933–1939.
 97. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews N C. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2008;7: 205–214.
 98. Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*. 2006; 281: 28494–28498.
 99. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*. 2009;9(3):217–227.
 100. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis*. 2002; 29: 327–35.
 101. Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F, Porto G. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood*. 2008;111:5727–33.
 102. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 2010;95:505–8.
 103. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*. 2006;55:667–74.
 104. Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D, Ganz T, Weinstein DA, Cunningham MJ: Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 48: 57–63.
 105. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. 2007; 13: 1096–1101.
 106. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113:1271–6.
 107. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007;117:1926–32.
 108. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*. 2008;111:924–31.
 109. Lakhal S, Schoedel J, Townsend AR, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signalling and iron homeostasis. *J Biol Chem*. 2011;286:4090–7.
 110. Peyssonnaud C, Nizet V, Johnson RS. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*. 2008;7(1):28–32.
 111. Choi SO, Cho YS, Kim HL, Park JW. ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(1):312–317.
 112. Braliou GG, Verga Falzacappa MV, Chachami G, Casanovas G, Muckenthaler MU, Simos G. 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression. *J Hepatol*. 2008;48(5):801–810.
 113. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*. 1999;274(34):24147–24152.
 114. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1999; 274(34):24142–24146.
 115. Mole DR. Iron homeostasis and its interaction with prolyl hydroxylases. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(4):445-58.
 116. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*. 2005;106(5):1864-1866.
 117. Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr*. 2010;30:105-122.
 118. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101(7):2461–2463.
 119. Tessel E, Galesloot SV, Anneke JGM, Siem MK. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*. 2011. 23;117(25):e218-25.
 120. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-1023.
 121. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E: Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005; 105: 4103–4105.
 122. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 2006;108(9):3204–3209.
 123. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*. 2007;109(1):353–358.
 124. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, Ernst M, Klein C, Trautwein C. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(1):294–300.

125. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(6):1906–1910.
126. Wang RH, Li C, Xu X, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2(6):399–409.
127. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4(1):33–41.
128. Zhang K, Shen X, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*. 2006;124(3):587–599.
129. Oliveira SJ, Pinto JP, Picarote G, et al. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBPalpha activity. *PLoS One*. 2009;4(8):e6618.
130. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrady I, Halada P, Kuchel P, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009; 113: 6225–36.
131. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008; 112: 4292–7.
132. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostri N, Kemna EH, Tjalsma H. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2706.
133. Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem*. 2011;57(12):1650–69.
134. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using Protein Chip System. *Blood*. 2006; 108: 1381–7.
135. Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25: 848–53.
136. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int*. 2009; 75: 976–81.
137. Costa E, Swinkels DW, Laarakkers CM, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F. et al. Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Acta Haematol*. 2009; 122: 226–9.