

PAWEŁ LIPIŃSKI, AGNIESZKA STYŚ, RAFAŁ R. STARZYŃSKI

*Zakład Biologii Molekularnej
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu
Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska
E-mail: p.lipinski@ighz.pl
agnieszka.malinowska@gmail.com
r.starzynski@ighz.pl*

ALKOHOL A METABOLIZM ŻELAZA

WSTĘP

Spożywanie napojów alkoholowych towarzyszy ludzkości już od ponad 10 tys. lat. Niezależnie od wymiarów kulturowych, religijnych, społecznych, ekonomicznych, ma ono również ścisły związek z patofizjologią człowieka. Nasz artykuł poświęcony jest toksycznej interakcji alkoholu etylowego z żelazem, mikroelementem wykorzystywanym przez niemal wszystkie organizmy żywe do kluczowych procesów biologicznych.

Alkohol etylowy (etanol), który powstaje na drodze fermentacji alkoholowej, czyli procesu rozkładu węglowodanów pod wpływem działania enzymów wytwarzanych przez drożdże, jest składnikiem różnego rodzaju napojów alkoholowych, związkem chemicznym, który szybko ulega wchłanianiu z przewodu pokarmowego i w niewielkim stopniu jest wydalany z organizmu z moczem lub poprzez drogi oddechowe. Jego metabolizm przebiega głównie w hepatocytach, które stanowią około 80% masy wątroby. Jednocześnie wątroba jest organem niezbędnym dla prawidłowego przebiegu ogólnoustrojowych przemian metabolicznych żelaza. Hepatocyty są głównym miejscem syntezy hepcydyny, peptydu regulującego zawartość i rozmieszczenie żelaza w organizmie. W makrofagach wątroby, komórkach Browicza-Kupffera, przebiega natomiast proces odzyskiwania żelaza z hemoglobiny starych, podlegających fagocytozie erytrocytów i jego przekierowania do ponownego użycia podczas syntezy hemu w komórkach prekursorowych erytrocytów.

Według danych WHO u ponad 73 milionów ludzi na świecie rozpoznano zaburzenia będące skutkiem nadużywania alkoholu (WHO 2004). Nadmierne, przewlekłe spożywanie alkoholu prowadzi między innymi do alkoholowej choroby wątroby (ang. alcohol liver disease, ALD), charakteryzującej się wieloczynnikową patogenezą, w której istotnym elementem jest stres oksydacyjny (MIRANDA-MENDEZ i współaut. 2010). Głównym szlakiem indukcji stresu oksydacyjnego w ALD jest stymulacja przez alkohol aktywności cytochromu P450 2E1 (CEDERBAUM 2006). Enzym ten metabolizuje szereg toksycznych substratów, a wśród nich etanol, do bardziej reaktywnych, prooksydacyjnych produktów, co wywołuje stres oksydacyjny, czyli zaburzenie równowagi między pro-oksydantami a systemami przeciwutleniającymi. Pierwszym stadium ALD jest stłuszczenie wątroby (ang. steatosis), stosunkowo łagodne zwyrodnienie wątroby objawiające się gromadzeniem lipidów w hepatocytach (następujące również podczas procesu starzenia się). Postęp choroby, spowodowany dalszą konsumpcją napojów alkoholowych, prowadzi do zwłóknienia (ang. fibrosis) i marskości (ang. cirrhosis) wątroby.

Stres oksydacyjny może być również wywołany przez żelazo nadmiernie gromadzone (spichrzane) w wątrobie. U podłoża stresu oksydacyjnego wywołanego przez żelazo leży tak zwany cykl Fentona, czyli cykl reakcji oksydoredukcyjnych między jonami żelaza a

reaktywnymi formami tlenu, takimi jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i nadtlenuk wodoru (H_2O_2). Produktem tych reakcji jest rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), jeden z najbardziej reaktywnych chemicznie związków, jakie istnieją w przyrodzie, charakteryzujący się wysokim potencjałem utleniającym i reagujący w sposób niekontrolowany z większością związków organicznych.

Spożycie alkoholu zakwalifikowano jako jeden z głównych czynników środowiskowych, istotnie wpływających na zaburzenie homeostazy żelaza. Współdziałanie alkoholu i żelaza w zaburzeniu funkcjonowania wątroby jest zjawiskiem znanym od dawna (HARRISON-FINDIK 2007). Nawet umiarkowanemu picciu alkoholu (10–30 g dziennie) nieodłącznie towarzyszy podwyższenie stężenia ferrytyny w surowicy krwi, zwiększone wysycenie transferyny jonami żelaza i zwiększenie zawartości żelaza w wątrobie (ROUAULT 2003). Nadmiar żelaza zalegającego w wątrobie może być zjawiskiem trwałym, gdyż obrót tego mikroelementu w organizmie człowieka dokonuje się w cyklu zamkniętym, co oznacza, że nie istnieje fizjologiczny, podlegający kontroli szlak usuwania żelaza z organizmu. Zagrożenie nadmierną akumulacją żelaza u osób pijących alkohol dotyczy w szczególno-

ści mężczyzn, gdyż cykliczna, comiesięczna utrata krwi występująca u kobiet w okresie rozrodczym prowadzi do regularnego uruchamiania żelaza z jego zapasów zgromadzonych w wątrobie (zawartość żelaza w 100 ml krwi o wartości hematokrytu 45% wynosi około 50 mg) (SIKORSKA i współaut. 2006).

Na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich latach ustalono, że główną przyczyną akumulacji żelaza u osób pijących napoje alkoholowe jest jego zwiększona absorpcja z diety (FLETCHER i współaut. 2003, CYLWIK i współaut. 2008). Określono również molekularny mechanizm tego zjawiska, polegający na hamowaniu przez alkohol ekspresji hepcydyny, peptydu hamującego absorpcję żelaza w dwunastnicy (HARRISON-FINDIK 2009). Synergistyczny, toksyczny efekt alkoholu i żelaza objawia się ze szczególną ostrością u hemochromatyków (FLETCHER i POWELL 2003). Konsumpcja alkoholu przez osoby obciążone mutacjami genu *HFE*, wywołującymi hemochromatozę typu 1A, najczęstszą chorobę genetyczną człowieka (FLETCHER i współaut. 2003), gwałtownie pogarsza obraz kliniczny tej patologii. Stąd abstynencja od alkoholu jest warunkiem niezbędnym dla powodzenia leczenia, polegającego najczęściej na regularnych upustach krwi.

ZARYS OGÓLNOUSTROJOWEJ HOMEOSTAZY ŻELAZA

Istotą zachowania ogólnoustrojowej homeostazy żelaza jest dostosowanie endogennej i egzogennej podaży żelaza (odpowiednio transportu żelaza z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego i absorpcji żelaza z diety) do popytu związanego głównie z wykorzystaniem tego mikroelementu w procesie erytropoezy. Homeostaza ta opiera się na współdziałaniu komórek różnych typów o ściśle wyspecjalizowanych funkcjach związanych z absorpcją, magazynowaniem żelaza, jego recyrkulacją oraz syntezą hemoglobiny. Od 10 lat wiadomo, że w koordynowaniu tych procesów główną rolę odgrywa hepcydyna (VIATTE i VAULONT 2009).

MOLEKULARNE MECHANIZMY WCHŁANIANIA ŻELAZA Z PRZEWODU POKARMOWEGO

Zdrowi dorośli ludzie wchłaniają z diety od 1 do 4 mg żelaza dziennie. Żelazo wchłaniane tą drogą ma na celu uzupełnienie niewielkich strat tego mikroelementu zawartego w złuszczonej skórze i komórkach nabłonka jelitowego. U kobiet w

wieku rozrodczym wchłaniane żelazo uzupełnia straty związane z comiesięcznym ubytkiem krwi, stąd też ilość żelaza absorbowanego dziennie przez kobiety jest nieznacznie większa (3–4 mg) niż przez mężczyzn (1–2 mg). Jednakże, o dużym potencjale pozyskiwania żelaza drogą wchłaniania z przewodu pokarmowego świadczą następujące dane: absorpcja żelaza u rocznego dziecka wynosi ok. 10 mg, u młodzieży w wieku dojrzewania 10–15 mg, u kobiety ciężarnej 20 mg. Patologiczna absorpcja, odnotowana u hemochromatyków może sięgać nawet 50 mg żelaza dziennie (PIETRANGELO 2010). Absorpcja żelaza u ssaków odbywa się głównie w dwunastnicy, chociaż ostatnio podkreśla się, że może być ono również wchłaniane w okrężnicy (BLACHIER i współaut. 2007). Żelazo może być wchłaniane zarówno w formie jonowej (tzw. żelazo nieorganiczne), jak i w postaci hemu (tzw. żelazo organiczne). Komórkami biorącymi czynny udział w transporcie żelaza ze światła dwunastnicy do krwi są enterocyty wierzchołkowe, znajdujące się w górnej

części kosmków jelitowych. Są to komórki spolaryzowane, które na odcinku błony komórkowej kontaktującym się ze światłem jelita oraz na odcinku zwróconym w stronę naczyń krwionośnych posiadają dwa tandemy białek (oksydaza lub reduktaza/transporter). W transporcie żelaza jonowego ze światła dwunastnicy do enterocyty biorą udział dwunastniczy cytochrom b (Dcytb) (MCKIE i współaut. 2001) i transporter metali dwuwartościowych (DMT1) (FLEMING i współaut. 1998). Z enterocyty do krwioobiegu żelazo jest uwalniane przez ferroportynę (FPN) (ABBOUD i HAILE 2000), przy współdziałaniu miedziozależnej ferrooksydazy hefajstyny (Heph) (VULPE i współaut. 1999). Molekularne mechanizmy absorpcji żelaza hemowego pozostawały do niedawna całkowicie nieznanymi, chociaż od dawna panuje pogląd, że żelazo zawarte w cząsteczkach hemu jest znacznie lepiej absorbowane niż żelazo nieorganiczne (ANDERSON i współaut. 2005). Dieta bogata w żelazo hemowe jest zalecana przy uzupełnianiu niedoborów żelaza u ludzi. Wykazano, że w procesie wchłaniania żelaza hemowego uczestniczy białko HCP1 (ang. heme carrier protein 1) (SHAYEGI i współaut. 2005), będące jednocześnie transporterem kwasu foliowego (ANDREWS 2007). W enterocycie hem ulega degradacji pod wpływem aktywności oksygenazy hemowej 1, a uwolnione jony żelaza wkracza na szlak absorpcji żelaza jonowego i podlega transportowi przez błonę boczo-podstawną przy udziale ferroportyny i hefajstyny.

RECYRKULACJA ŻELAZA HEMOWEGO W ORGANIZMIE

Ponowne, biologiczne wykorzystanie żelaza, pochodzącego z degradacji hemu zawartego w fagocytowanych erytrocytach, jest jednym z najważniejszych szlaków metabolizmu żelaza u większości ssaków. W recykulacji uczestniczą makrofagi występujące w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym. W wyniku recykulacji żelaza hemowego przez te komórki, w organizmie dorosłego człowieka do krwi dostaje się w ciągu doby ok. 20 mg żelaza jonowego, czyli 10-krotnie więcej niż wynosi dobową absorpcję żelaza przez enterocyty. Prawidłowe funkcjonowanie tego procesu ma zasadnicze znaczenie dla ogólnoustrojowej homeostazy żelaza. Jego zaburzenie prowadzi do uruchomienia rezerw żelaza zgromadzonych w hepatocytach znacznie szybciej niż zaburzenie wchłaniania żelaza. Przy długotrwałych zaburzeniach re-

cykulacji żelaza przez makrofagi dochodzi do tzw. funkcjonalnego niedoboru żelaza objawiającego się hypoferremią, niskim wysyceniem transferyny jonami żelaza, niewydolną erytropoezą i paradoksalną w obliczu tych zjawisk nadmierną akumulacją żelaza w makrofagach. Makrofagi fagocytują stare i uszkodzone erytrocyty i odprowadzają do krążenia żelazo uwolnione w wyniku degradacji hemu. W tym celu wyposażone są w bogaty arsenał białek niezbędnych do degradacji hemu, transportu i magazynowania żelaza wewnątrz komórki i wreszcie jego transportu do środowiska pozakomórkowego. W degradacji hemu uczestniczą enzymy z rodziny oksygenaz hemowych (HO): indukowalny enzym HO-1 i konstytutywny HO-2 (KIKUCHI i współaut. 2005). Żelazo uwolnione z hemu może być włączone do ferrytyny. W większości jednak jest transportowane przez ferroportynę na zewnątrz komórki, gdzie jest utleniane przez ceruloplazminę, a następnie wiązane przez transferynę i rozprowadzane głównie do szpiku kostnego, gdzie wykorzystane jest do syntezy hemu przez komórki prekursorowe erytrocytów. Na błonie makrofagów zidentyfikowano również białko FLVCR (ang. feline leukemia virus, subgroup C, receptor), transportujące do krwi nadmiar hemu znajdującego się w cytoplazmie tych komórek (KEEL i współaut. 2008).

ERYTROPOEZA – PROCES O NAJWIĘKSZYM WYKORZYSTANIU ŻELAZA W ORGANIZMIE

Komórkami o największym w zapotrzebowaniu na żelazo są erytroblasty, komórki prekursorowe erytrocytów w szpiku kostnym. Dzięki wysokiej ekspresji na błonach proerytroblastów receptora transferyny 1 (PONKA i LOK 1999), komórki te intensywnie pobierają żelazo związane z transferyną. Żelazo pobrane przez erytroblasty niemal wyłącznie jest wykorzystywane do syntezy hemu, który jest następnie włączany do cząsteczek hemoglobiny. Nasilenie syntezy hemu w erytroblastach jest o ponad rząd wielkości większe niż w komórkach nieerytroidalnych. W erytroblastach funkcjonuje mechanizm detoksyfikacji wolnego hemu niewykorzystanego do syntezy hemoglobiny, polegający na usunięciu jego nadmiaru do krwi przez wspomniane już białko FLVCR. Delecja genu kodującego FLVCR u myszy jest letalna na etapie życia płodowego (KEEL i współaut. 2008), natomiast unieczynnienie tego genu we wczesnym okresie neonatalnym skutkuje niedokrwistością, której

przyczyną jest zahamowanie różnicowania się erytroblastów, u podłoża której leży z kolei toksyczność wolnego hemu niewykorzystanego do syntezy hemoglobiny. Synteza hemu pozostaje pod ścisłą kontrolą wewnątrzkomórkowego systemu IRP/IRE (ang. Iron Regulatory Protein/Iron Regulatory Element), przynajmniej w odniesieniu do syntazy aminolewulinowej 2 (ALAS-2), cytoplazmatycznego enzymu, biorącego udział w pierwszym etapie syntezy hemu w prekursorach erytrocytów. Translacja mRNA kodującego ALAS-2 podlega regulacji zgodnie z kanonem obowiązującym dla mRNA zawierających sekwencje IRE w regionie 5'UTR (DANDEKAR i współaut. 1990). Z kolei ostatni etap syntezy hemu, umiejscowiony w mitochondriach, polegający na włączeniu cząsteczki hemu do protoporfiryny IX, jest katalizowany przez ferrochelatazę, białko posiadające centrum aktywne [2Fe-2S] (CHAN i współaut. 1993).

HEPCYDYNA – PEPTYD REGULUJĄCY ZAWARTOŚĆ I ROZMIESZCZENIE ŻELAZA W ORGANIZMIE

Hepcydynę po raz pierwszy wyizolowano z ultrafiltratu krwi i moczu pacjentów cierpiących na infekcje bakteryjne (PARK i współaut. 2001). Hepcydyna nosiła pierwotnie nazwę LEAP-1 (ang. liver expressed antimicrobial peptide-1) (KRAUSE i współaut. 2000). Zidentyfikowano ją jako kationowy peptyd o stosunkowo szerokim zakresie aktywności przeciwgrzybiczej i bakteriobójczej należący do rodziny defensyn (KRAUSE i współaut. 2000, PARK i współaut. 2001). Hepcydyna syntezowana jest jako 84-aminokwasowy peptyd zawierający sekwencje sygnalizacyjną, niezbędną do jej ekspresji na siateczce śródplazmatycznej, i sekwencję rozszczepiania prohormonów przez konwertazy. Do krwi uwalniana jest jako peptyd o 25 aminokwasach. U człowieka gen hepicydyny (*HAMP*) leży na chromosomie 19. U myszy występują dwie kopie genu *Hamp1* i *Hamp2*, leżące na chromosomie 11 (PIGEON i współaut. 2001). Analiza sekwencji w regionie 5' flankującym ludzki i mysi gen *HAMP1* pozwoliła zidentyfikować sekwencje wiążące czynniki transkrypcyjne specyficzne dla wątroby: C/EBP (ang. CCAAT/enhancer-binding protein) i HNF4 (ang. hepatocyte nuclear factor 4), odpowiedzialne za ekspresję genu *HAMP1*. Wykazano, że czynnik C/EBP α bierze udział w indukcji genu *HAMP1* przez żelazo (COURSELAUD i współaut. 2002).

Po raz pierwszy powiązania między hepicydyną a metabolizmem żelaza dokonali PIGEON i współaut. (2001), którzy stwierdzili zwiększoną ekspresję mRNA hepicydyny w wątrobach myszy nastrzykiwanych dekstranem żelaza oraz u myszy karmionych dietą wzbogaconą żelazem. Przełomem w badaniach nad hepicydyną okazały się prace NICOLAS i współaut. (2001, 2002a), którzy u myszy z nieczynnym genem *Hamp* wykazali toksyczną akumulację żelaza w wątrobie i innych organach (NICOLAS i współaut. 2001), a u myszy transgenicznym z nadekspresją tego genu, drastyczny niedobór żelaza objawiający się ostrą niedobarwliwą niedokrwistością mikrocytarną (NICOLAS i współaut. 2002a). Ważnym krokiem potwierdzającym rolę hepicydyny w regulacji metabolizmu żelaza było zidentyfikowanie mutacji w genie *HAMP* u osób cierpiących na nowy rodzaj hemochromatozy, różniącej się od klasycznej hemochromatozy (sklasyfikowanej jak typ 1), u podłoża której leży mutacja genu *HFE* (genu hemochromatozy) powodująca znacznie bardziej intensywną akumulację żelaza w narządach wewnętrznych pacjentów (ROETTO i współaut. 2003). Ponieważ toksyczne skutki akumulacji żelaza widoczne były u osób z mutacjami genu *HAMP*, które nie przekraczały 30 roku życia (klasyczna hemochromatoza związana z mutacją genu *HFE* objawia się zwykle w 5-tej dekadzie życia), patologię tę określono jako hemochromatozę wieku młodzieńczego i sklasyfikowano jako typ 2B. Obraz kliniczny młodzieńczej hemochromatozy jest wyjątkowo drastyczny. Charakterystycznymi objawami są hipogonadyzm, kardiomiopatia, marskość wątroby, cukrzyca, choroby stawów.

Powszechnie występującą u ludzi patologią związaną z nadmierną syntezą hepicydyny jest hypoferremia i niedokrwistość związana z przewlekłym stanem zapalnym (WEISS 2009). Obok niedoboru żelaza, jest to najczęściej diagnozowana etiologia niedokrwistości u ludzi. Spośród osób cierpiących na różnego rodzaju niedokrwistości, pacjenci z niedokrwistością na tle stanu zapalnego najczęściej wymagają hospitalizacji.

Obniżenie stężenia jonów żelaza w płynach biologicznych organizmu gospodarza jest od dawna znanym mechanizmem odporności nieswoistej ssaków, który ma na celu ograniczenie biologicznej dostępności jonów żelaza dla mikroorganizmów chorobotwórczych (WEINBERG 1996). Gdy stan

zapalny przedłuża się, hypofferemia zaczyna jednak również negatywnie wpływać na organizm gospodarza, głównie poprzez stopniowo rozwijającą się niedokrwistość. Badania ostatnich lat wskazują na hepcydynę jako na głównego mediatora zaburzeń metabolizmu żelaza towarzyszącym stanom zapalnym (ROY 2005). Wielokrotnie zwiększoną ekspresję hepcydyny stwierdzono zarówno u zwierząt, u których doświadczalnie wywołano stan zapalny, jak i u pacjentów cierpiących na choroby nowotworowe i zakażenia bakteryjne. Utrzymująca się, podwyższona synteza hepcydyny u pacjentów ze stanami zapalnymi jest ściśle powiązana z występującą u nich hypoffermią i niedokrwistością, która nie ustępuje nawet w przypadku zwiększenia zawartości żelaza w diecie. Wydaje się, że hypofferemia stanu zapalnego nie jest wynikiem bezwzględnego niedoboru żelaza w organizmie, ale niedoboru funkcjonalnego związanego w dużej mierze ze zwiększoną retencją żelaza w makrofagach tkankowych (szczególnie w makrofagach wątroby i śledziony) i ograniczoną jego recyrkulacją do układu krążenia. Badania zmierzające do wyjaśnienia roli hepcydyny w stanie zapalnym dowiodły, że syntezę hepcydyny regulują prozapalne cytokiny: interleukina-1 β i -6 (IL-1 β i IL-6) (WRIGHTING i ANDREWS 2006, VERGA FALZACAPPA i współaut. 2007). W przypadku tej ostatniej, wyjaśniono mechanizm transkrypcyjnej aktywacji genu *HAMP*, w której bierze udział czynnik transkrypcyjny STAT3 (WRIGHTING i ANDREWS 2006, VERGA FALZACAPPA i współaut. 2007).

Już pionierskie prace Nicolas, prowadzone na dwóch modelach genetycznie zmodyfikowanych myszy: na myszach z nieczynnym genem *Hamp* (NICOLAS i współaut. 2001) i z nadekspresją tego genu (NICOLAS i współaut. 2002a), sugerowały, że hepcydyna hamuje zarówno absorpcję żelaza z przewodu pokarmowego, jak i recyrkulację żelaza z makrofagów wątroby i śledziony. Spostrzeżenia te zostały w pełni potwierdzone w oparciu o analizę przeciwstawnych fenotypów żelaza, z jednej strony, u hemochromatyków, z drugiej, u chorych z przewlekłym stanem zapalnym. Fenotypy te związane były odpowiednio z niedoborem hepcydyny na tle mutacji genu *HAMP* i zależną od cytokin nadmierną ekspresją hepcydyny. Zarówno w przypadku hamowania absorpcji, jak i recyrkulacji żelaza zaproponowano jednorodny

biologiczny mechanizm działania hepcydyny, polegający na interakcji tego peptydu z ferroportyną (NEMETH i współaut. 2004, DE DOMENICO i współaut. 2007). Hepcydyna, uwalniana z hepatocytów do krwi, wiąże się z ferroportyną występującą zarówno na błonie komórkowej enterocytów, jak i makrofagów. W wyniku tej interakcji następuje przemieszczenie ferroportyny do cytoplazmy, a następnie jej degradacja w lizosomach. Brak jedynego transportera żelaza z komórki do środowiska pozakomórkowego powoduje akumulację żelaza w komórkach. Akumulacja żelaza w enterocytach, które po 2 dniach funkcjonowania ulegają złuszczeniu do światła jelita oznacza zahamowanie absorpcji żelaza. Z kolei zahamowanie przepływu żelaza z makrofagów do krwi, ze względu na duże dobowe ilości transportowanego tą drogą żelaza, może już w ciągu kilku dni doprowadzić sukcesywnie do hypoffermii i niedokrwistości na tle niedoboru żelaza. Akumulacja żelaza w makrofagach może okazać się toksyczna dla tych komórek, gdy przekroczona zostanie zdolność ferrytyny do detoksyfikacji tego metalu. Brak hepcydyny oznacza brak negatywnej kontroli ilości absorbowanego żelaza i na przestrzeni kilku lat może doprowadzić do przeciążenia organizmu żelazem, co w drastycznym wymiarze obserwuje się u osób z mutacjami genu *HAMP*.

Wyniki badań ostatnich kilku lat pokazują różnorodność i złożoność mechanizmów molekularnych sterujących syntezą hepcydyny (NEMETH i GANZ 2009, VIATTE i VAULONT 2009). Wyodrębniono co najmniej 4 szlaki regulacji ekspresji genu *Hamp*. Szlaki te uruchamiane są w warunkach hipoksji (NICOLAS i współaut. 2002b), stanu zapalnego (WRIGHTING i ANDREWS 2006, VERGA FALZACAPPA i współaut. 2007), inicjują je zmiany w aktywności erytropoezy (NEMETH 2008) i zawartości żelaza w organizmie (PIGEON i współaut. 2001). W regulacji syntezy hepcydyny przez żelazo uczestniczą cząsteczki sygnalizacyjne (z rodziny bone morphogenetic proteins, głównie BMP6, holo-Tf), rozbudowany układ receptorów/przekaźników sygnałów (białko hemochromatozy, HFE; błonowa hemojuwelina, mHJV, receptor transferyny, 2 TfR2), białek modulujących przekazywanie sygnałów (rozpuszczalna hemojuwelina – sHJV, neogenina, furyna) matryptaza-2, TMPRSS2, i czynniki transkrypcyjne (czynniki z rodziny SMAD; głównie SMAD4) (NEMETH i GANZ 2009, VIATTE i VAULONT 2009).

MOLEKULARNE MECHANIZMY AKUMULACJI ŻELAZA W WĄTROBIE POD WPŁYWEM ETANOLU

Już od dawna sugerowano, że zwiększenie zapasów żelaza w wątrobie osób regularnie pijących alkohol jest skutkiem zwiększonej absorpcji tego mikroelementu. Jest to jedyne logiczne wytłumaczenie akumulacji żelaza w wątrobie, biorąc pod uwagę fakt, że zawartość żelaza w organizmie człowieka regulowana jest poprzez absorpcję z diety, a także to, że u osób nadużywających alkohol nie obserwuje się na ogół patologii czerwonych krwinek (na przykład hemolizy), które mogą wpływać na znaczące ilościowo przemieszczenie żelaza z erytrocytów do wątroby. Podwyższona absorpcja żelaza leży u podłoża syderozy Bantu, występującej u ludności murzyńskiej z Południowej Afryki (głównie przedstawicieli szczepu Bantu), pijącej na co dzień warzone przez siebie piwo (BUCHANAN 1969). W tym konkretnym przypadku sugerowano początkowo, że zwiększona akumulacja żelaza w wątrobie jest pochodną wysokiej zawartości żelaza w piwie, które przenika do tego napoju z żelaznych naczyń, w których je przygotowują. Należy jednak podkreślić, że zbyt wysoka zawartość żelaza w diecie jest warunkiem koniecznym, lecz niewystarczającym zwiększonej absorpcji, ponieważ jest ona procesem, który w warunkach fizjologicznych podlega rygorystycznej regulacji, odzwierciedlającej stan zapasów żelaza w wątrobie. Z reguły jedynie 15% żelaza zawartego w diecie podlega transportowi przez enterocyty dwunastnicy do krwi. Nadmiar żelaza w organizmie jest z reguły skutkiem zaburzenia wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego, powodowanego najczęściej przez mutacje genów kodujących białka kontrolujące absorpcję żelaza lub bezpośrednio biorące udział w tym procesie. Do zespołów nadmiernego gromadzenia żelaza w organizmie należą uwarunkowane genetycznie, różnego typu pierwotne hemochromatozy (PIETRANGELO 2010). Patologiczna akumulacja żelaza w organizmie może mieć również charakter wtórny i występować jako skutek innych chorób wrodzonych lub nabytych. Najczęściej towarzyszy niedokrwistościom, które wymagają regularnych przetoczeń krwi (np. β -talasemii) (GALANELLO i ORIGA 2010).

REGULACJA EKSPRESJI HEPCYDYNY PRZEZ ETANOL

Absorpcja jest jednym spośród procesów metabolicznych żelaza, które w ostatnich

15 latach znalazły molekularną podbudowę. Kluczową rolę w kontroli ilości żelaza absorbowanego do organizmu przypisuje się hepcydynie, peptydowi syntetyzowanemu głównie w wątrobie, którego ekspresja zależy od zawartości żelaza w tym organie, i który hamuje transport żelaza z enterocytów absorpcyjnych dwunastnicy do krwi. Obniżona synteza hepcydyny leży u podłoża wielu genetycznych i nabytych patologii charakteryzujących się nadmiernym gromadzeniem żelaza w organizmie (PIETRANGELO 2010). W oparciu o doświadczalne modele zwierzęce (myszy i szczury) wykazano, że przewlekłe pojenie alkoholem wpływa na obniżenie w wątrobie ekspresji genu kodującego hepcydynę (BRIDLE i współaut. 2006, HARRISON-FINDIK i współaut. 2006, HARRISON-FINDIK 2007, HERITAGE i współaut. 2009). Efekt ten obserwowano u zwierząt, którym podawano do picia 10–20% alkohol przez co najmniej 7 dni (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). Opisano również przypadek 55-letniej kobiety, nadużywającej przez ponad 10 lat alkohol, u której oznaczono bardzo niski poziom hepcydyny w moczu (IQBAL i współaut. 2009). W badaniach *in vitro* stwierdzono obniżenie ekspresji hepcydyny zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w komórkach VL-17A, hodowanych w pożywce zawierającej 25 mM etanol (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). U myszy i szczurów pojonych alkoholem, u których stwierdzono obniżenie poziomu mRNA hepcydyny w wątrobie, odnotowano również zwiększoną ekspresję ferroportyny w dwunastnicy (BRIDLE i współaut. 2006, HARRISON-FINDIK i współaut. 2006), zgodnie z regułą regulacji ekspresji tego białka przez hepcydynę (NEMETH i współaut. 2004, DE DOMENICO i współaut. 2007). Dane te wskazują, że picie alkoholu uruchamia regulacyjny mechanizm na osi hepcydyna-ferroportyna, prowadzący do wzmożonej absorpcji żelaza z diety, i w konsekwencji do jego nadmiernej akumulacji w wątrobie. Ponieważ, jak już wspomniano, żelazo jest silnym czynnikiem indukującym syntezę hepcydyny, nasuwa się pytanie, czy żelazo, które akumuluje się w wątrobie pod wpływem konsumpcji alkoholu, przeciwdziała obniżeniu ekspresji hepcydyny przez alkohol. U myszy i szczurów, którym podawano w diecie przez 3 tygodnie karbonylkowe żelazo, stwierdzono 3-krotny wzrost poziomu mRNA hepcydyny w wątrobie. Gdy zwierzęta te pojono następnie przez tydzień 10% alko-

holem, ekspresja hepcydyny ulegała drastycznemu obniżeniu. U zwierząt tych alkohol przywracał również do poziomu kontrolnego obniżoną ekspresję ferroportyny w enterocytach dwunastnicy (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). U myszy z nokautem genu *Hfe* (mysi model hemochromatozy typu 1A u ludzi), charakteryzujących się podwyższoną zawartością żelaza i niską ekspresją hepcydyny w wątrobie, alkohol wpływał na jeszcze bardziej wyraźny spadek ekspresji tego peptydu (HARRISON-FINDIK i współaut. 2007). Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują, że alkohol skutecznie antagonizuje indukcję ekspresji hepcydyny przez żelazo, a tym samym narusza sprzężenie zwrotne między poziomem żelaza w wątrobie, hepcydyną i absorpcją żelaza z przewodu pokarmowego, które funkcjonuje w warunkach fizjologicznych.

Przydatnym modelem w badaniach nad molekularnym mechanizmem regulacji ekspresji hepcydyny przez alkohol stały się komórki VL-17A, które wyprowadzono z linii komórek ludzkiego raka wątroby HepG2. W przeciwieństwie do komórek HepG2, komórki VL-17A metabolizują etanol, gdyż wskutek transfekcji stabilnie ekspresyjują enzymy biorące udział w oksydacyjnym metabolizmie etanolu: dehydrogenazę alkoholową (ADH) i cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) (DONOHUE i współaut. 2006). W komórkach VL-17A poddanych działaniu 25 mM etanolu ekspresja hepcydyny na poziomie mRNA była 3-krotnie zmniejszona. Obniżenie ekspresji hepcydyny skutecznie blokowano dodając do pożywki, w której hodowane były komórki, inhibitor (4-metylopirazol) hamujący aktywności enzymów metabolizujących alkohol. W komórkach HepG2 nie obserwowano zmian w poziomie mRNA hepcydyny pod wpływem etanolu (BRIDLE i współaut. 2006).

Stres oksydacyjny jest jednym z głównych czynników inicjujących ALD i prowadzących do jej rozwoju (MIRANDA-MENDEZ i współaut. 2010). Chociaż zarówno ADH, jak i CYP2E1 uczestniczą w metabolizmie etanolu, to jednak przy nadmiernej i przewlekłej jego konsumpcji, udział CYP2E1 w tym procesie zwiększa się. Co istotne, etanol wywołuje indukcję ekspresji i aktywności CYP2E1 (CEDERBAUM 2006). W wyniku utleniania etanolu przez CYP2E1 powstają reaktywne związki aldehyd octowy i rodnik 1-hydroksyetylowy, a także reaktywne formy tlenu (RFT). Kluczową obserwacją, w badaniach nad mechanizmem wywołującym obniżenie ekspresji hepcydyny przez alkohol, jest znie-

sienie efektu hamowania ekspresji hepcydyny w wątrobie myszy pojonych alkoholem, przez równolegle podawane zwierzętom w diecie przeciwutleniacze: N-acetylocysteinę i witaminę E (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). Autorzy tych badań sugerują, że RFT i inne czynniki prooksydacyjne, wytwarzane w trakcie procesów metabolicznych etanolu odbywających się przy udziale ADH i CYP2E1, uczestniczą w hamowaniu ekspresji hepcydyny na poziomie transkrypcji. Rola RFT w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów jest dobrze udokumentowana (LIU i współaut. 2005), tak więc, wspomniana sugestia jest wielce prawdopodobna, tym bardziej, że hepatocyty są głównymi komórkami wątroby, w których metabolizowany jest etanol i w których odbywa się synteza hepcydyny. W komórkach HepG2, w których nie dochodzi do obniżenia ekspresji hepcydyny po traktowaniu etanolem (ze względu na brak aktywności ADH i CYP2E1), efekt ten był widoczny po traktowaniu nadtlenkiem wodoru (co miało imitować stres oksydacyjny wywołany przemianami metabolicznymi etanolu) (NICOLAS i współaut. 2002b). Badania funkcjonalne aktywności promotora genu hepcydyny (*Hamp1*) w komórkach VL-17A hodowanych w obecności etanolu wykazały obniżoną jego aktywność. W komórkach tych stwierdzono również obniżony poziom czynnika transkrypcyjnego C/EBP α , który jest silnym aktywatorem transkrypcji genów hepcydyny mysiej i ludzkiej (COURSELAUD i współaut. 2002). W konsekwencji obserwowano zmniejszone wiązanie C/EBP α do sekwencji DNA wiążącej czynniki z rodziny C/EBP, występującej w promotorze genu hepcydyny (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). Wyciszenie genu kodującego C/EBP α techniką siRNA w komórkach VL-17A powodowało obniżenie poziomu hepcydyny, co dowodzi, że czynnik ten bierze udział w regulacji konstytutywnej ekspresji hepcydyny (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006). Doświadczenia *in vivo* na myszach pojonych alkoholem i traktowanych N-acetylocysteiną i witaminą E wykazały również, że C/EBP α bierze udział w regulacji transkrypcyjnej hepcydyny w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez etanol (HARRISON-FINDIK i współaut. 2006).

Wkrótce po odkryciu funkcji biologicznej hepcydyny wykazano, że ekspresja genu *Hamp* ulega obniżeniu w hipoksji (Nicolas i wsp. 2002b). W toku dalszych badań stwierdzono, że czynnik transkrypcyjny HIF1 α (ang. hypoxia inducible factor 1 α) bierze udział w

hamowaniu transkrypcji genu *Hamp* (PEYSSONNAUX i współaut. 2007). Czynniki z rodziny HIF, są głównymi czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi w warunkach hipoksji, które regulują ekspresję wielu genów, w celu przystosowania organizmu do funkcjonowania w warunkach zmniejszonego stężenia tlenu. Biologiczny sens obniżenia ekspresji hepcydyny w hipoksji polega na zwiększeniu podaży żelaza dla komórek prekursorowych erytrocytów w szpiku kostnym, intensywnie wykorzystujących żelazo do syntezy hemu w warunkach pobudzonej w hipoksji erytropoezy. Obniżenie ekspresji hepcydyny w hipoksji prowadzi kolejno do zwiększenia absorpcji żelaza z diety i większego uwalniania żelaza z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego poprzez regulację na osi hepcydyna-ferroportyna, podwyższenia stężenia żelaza w surowicy krwi i dostarczenia większej ilości żelaza do pro-erytoblastów. Występowanie hipoksji w komórkach wątroby udokumentowano w przypadkach przewlekłego spożywania alkoholu (FRENCH i współaut. 1984). U myszy pojonych alkoholem stwierdzono podwyższony poziom HIF1 α i obniżony poziom mRNA hepcydyny w wątrobie, co sugeruje, że czynnik ten może brać udział w transkrypcyjnej regulacji hepcydyny. Mimo wzrostu poziomu HIF1 α nie wykazano jednak zmian w ekspresji ge-

nów kodujących czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. vascular endothelial growth factor) i śródbłonkową syntazę tlenu azotu (ang. nitric oxide synthase 3), o których wiadomo, że podlegają regulacji w hipoksji poprzez HIF1 α (COURSELAUD i współaut. 2002). Na bazie doświadczeń *in vitro* przeprowadzonych na komórkach HepG2 hodowanych w środowisku 3% tlenu zaproponowano alternatywny, niezależny od HIF1 α mechanizm obniżenia ekspresji hepcydyny w hipoksji. W mechanizmie tym istotną rolę odgrywają RFT generowane w komórkach HepG2 przy niskim stężeniu tlenu. Udowodniono to, inkubując komórki HepG2 pozostające w hipoksji z N-acetylocysteiną i DTT. W obecności tych przeciwutleniaczy, ekspresja hepcydyny w komórkach HepG2 pozostawała bez zmian zarówno na poziomie mRNA i białka. W badaniach tych potwierdzono również rolę czynnika C/EBP α w transkrypcyjnej regulacji genu *HAMP* przez RFT, a także zasugerowano podobną rolę czynnika STAT3 (CHOI i współaut. 2007). Wydaje się, że niezależnie od podłoża stresu oksydacyjnego wywołanego przez etanol (oksydacyjny metabolizm etanolu czy indukowana przez etanol hipoksja), RFT odgrywają istotną rolę w transkrypcyjnej regulacji (obniżeniu) ekspresji genu *HAMP*.

UWAGI KOŃCOWE

Toksyczna interakcja etanolu i żelaza w rozwoju alkoholowej choroby wątroby jest dobrze udokumentowana. Badania na zwierzętach laboratoryjnych sugerują, że etanol wpływa na zmniejszenie ekspresji hepcydyny w wątrobie, co wpływa na zwiększenie absorpcji żelaza i w konsekwencji prowadzi do nadmiernej akumulacji żelaza w wątrobie. Wyniki badań na modelach zwierzęcych wymagają niewątpliwie potwierdzenia w badaniach na ludziach. Nieodzowne wydają się regularne pomiary poziomu hepcydyny w krwi i moczu osób nadużywających alkohol. Należy również podkreślić, że chociaż etanol jest podstawowym składnikiem napojów

alkoholowych, to jednak pozostałe ich składniki mogą modulować efekty biologiczne etanolu. Powszechnie znane jest zjawisko stosunkowo niskiej zapadalności Francuzów na choroby sercowo-naczyniowe (tzw. francuski paradoks), co jest związane z piciem dużych ilości czerwonych win, które zawierają związki o właściwościach antyoksydacyjnych (LIPPI i współaut. 2010). W tym kontekście nasuwa się pytanie, czy przeciwutleniacze zawarte w niektórych napojach alkoholowych mogą przeciwdziałać skutkom stresu oksydacyjnego generowanego w trakcie metabolizmu etanolu, a wśród nich obniżeniu ekspresji hepcydyny.

ALKOHOL A METABOLIZM ŻELAZA

Streszczenie

Spożywanie alkoholu wiąże się z zaburzeniem metabolizmu żelaza. U pacjentów z alkoholową cho-

robą wątroby stwierdza się często zwiększoną zawartość żelaza w wątrobie, będącą skutkiem zwięks-

szanej absorpcji żelaza w dwunastnicy. W ostatnich 12 latach dokonał się ogromny postęp w poznaniu molekularnych podstaw homeostazy żelaza u ssaków. Odkrycie hepcydyny, peptydu syntetyzowanego w wątrobie oraz jej roli w regulacji uwalniania żelaza z enterocytów absorpcyjnych i z makrofagów miało szczególnie duże znaczenie w poznaniu szlaków cykulacji żelaza w organizmie. Wiązanie się hepcydyny z występującą na błonie enterocytów ferroportyną, jedynym jak dotąd poznanym u ssaków eksporterem żelaza, powoduje przemieszczenie jej do wnętrza

enterocytów a następnie degradację w lizosomach, co prowadzi do zahamowania absorpcji żelaza z diety. Molekularny mechanizm leżący u podłoża nadmiernej akumulacji żelaza w organizmie wywołanej przez spożywanie alkoholu polega na zahamowaniu ekspresji hepcydyny, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia transportu żelaza z enterocytów do krwioobiegu. Stres oksydacyjny wywołany przez alkohol ulega zaostrzeniu przez nadmierną akumulację żelaza w wątrobie i jest przyczyną uszkodzenia wątroby u pacjentów z alkoholową chorobą wątroby.

ALCOHOL AND IRON METABOLISM

Summary

Consumption of alcohol is known to be associated with misregulation of iron metabolism. Patients with alcoholic liver disease frequently exhibit increased hepatic iron content, which is caused by the increased iron absorption in duodenum. Within the past 12 years an enormous progress has been made in understanding molecular basis of mammalian iron homeostasis. In particular, the discovery of liver-derived peptide, hepcidin, and its role in the concerted regulation of iron release from absorptive enterocytes and macrophages through interaction with ferroportin, the sole cellular iron exporter known in mammalian cells, has proved to be fundamental in

the understanding of iron circulation in the body. The binding of hepcidin to ferroportin expressed at the surface of enterocytes induces its internalization and degradation, which in turn inhibits iron absorption from the diet. The molecular mechanisms underlying alcohol-induced iron accumulation in the body involves suppression of hepcidin expression in hepatocytes, which in consequence leads to increased duodenal iron transport. Exacerbation of alcohol-induced oxidative stress in the liver by iron overload is responsible for liver injury observed in the alcoholic liver disease.

LITERATURA

- ABBOUD S., HAILE D. J., 2000. *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J. Biol. Chem. 275, 19906–19912.
- ANDERSON G. J., FRAZER D. M., MCKIE A. T., VULPE C. D., SMITH A., 2005. *Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism*. Biometals 18, 339–348.
- ANDREWS N. C., 2007. *When is a heme transporter not a heme transporter? When it's a folate transporter*. Cell Metab. 5, 5–6.
- BLACHIER F., VAUGELADE P., ROBERT V., KIBANGOU B., CANONNE-HERGAUX F., DELPAL S., BUREAU F., BLOTTIÈRE H., BOUGLÉ D., 2007. *Comparative capacities of the pig colon and duodenum for luminal iron absorption*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 85, 185–192.
- BRIDLE K., CHEUNG T. K., MURPHY T., WALTERS M., ANDERSON G., CRAWFORD D. G., FLETCHER L. M., 2006. *Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 30, 106–112.
- BUCHANAN W. M., 1969. *Bantu siderosis – a review*. Cent. Afr. J. Med. 15, 105–113.
- CEDERBAUM A. I., 2006. *Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells*. J. Gastroenterol. Hepatol. 3 (Suppl.), S22–S25.
- CHAN R. Y., SCHULMAN H. M., PONKA P., 1993. *Expression of ferrochelatase mRNA in erythroid and non-erythroid cells*. Biochem. J. 292, 343–349.
- CHOI S. O., CHO Y. S., KIM H. L., PARK J. W., 2007. *ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 356, 312–317.
- COURSELAUD B., PIGEON C., INOUE Y., INOUE J., GONZALEZ F. J., LEROYER P., GILOT D., BOUDJEMA K., GUGUEN-GUILLOUZO C., BRISOT P., LORÉAL O., ILYIN G., 2002. *C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism*. J. Biol. Chem. 277, 41163–41170.
- CYLWIK B., CHROSTEK L., SZMITKOWSKI M., 2008. *The effect of alcohol on the regulation of iron metabolism*. Pol. Merkur. Lekarski. 25, 273–275.
- DANDEKAR T., STRIPECKE R., GRAY N. K., GOOSEN B., CONSTABLE A., JOHANSSON H. E., HENTZE M. W., 1990. *Identification of a novel iron responsive element in murine and human erythroid δ aminolevulinic acid synthase mRNA*. EMBO J. 10, 1903–1909.
- DE DOMENICO I., WARD D. M., LANGELIER C., VAUGHN M. B., NEMETH E., SUNDQUIST W. I., GANZ T., MUSCI G., KAPLAN J., 2007. *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. Mol. Biol. Cell. 18, 2569–2578.
- DONOHUE T. M., OSNA N. A., CLEMENS D. L., 2006. *Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 38, 92–101.
- FLEMING M. D., ROMANO M. A., SU M. A., GARRICK L. M., GARRICK M. D., ANDREWS N. C., 1998. *Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1148–1153.

- FLETCHER L. M., POWELL L. W., 2003. *Hemochromatosis and alcoholic liver disease*. Alcohol 30, 131-136.
- FLETCHER L. M., BRIDLE K. R., CRAWFORD D. H., 2003. *Effect of alcohol on iron storage diseases of the liver*. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 17, 663-677.
- FRENCH S. W., BENSON N. C., SUN P. S., 1984. *Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed rats*. Hepatology 4, 912-917.
- GALANELLO R., ORIGA R., 2010. *Beta-thalassemia*. Orphanet. J. Rare. Dis. 5, 11.
- HARRISON-FINDIK D. D., 2007. *Role of alcohol in the regulation of iron metabolism*. World J. Gastroenterol. 13, 4925-4930.
- HARRISON-FINDIK D. D., 2009. *Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease?* World J. Gastroenterol. 15, 1186-1193.
- HARRISON-FINDIK D. D., SCHAFER D., KLEIN E., TIMCHENKO N. A., KULAKSIZ H., CLEMENS D., FEIN E., ANDRIOPOULOS B., PANTOPOULOS K., GOLLAN J., 2006. *Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression*. J. Biol. Chem. 281, 22974-22982.
- HARRISON-FINDIK D. D., KLEIN E., CRIST C., EVANS J., TIMCHENKO N., GOLLAN J., 2007. *Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol*. Hepatology 46, 1979-85.
- HERITAGE M. L., MURPHY T. L., BRIDLE K. R., ANDERSON G. J., CRAWFORD D. H., FLETCHER L. M., 2009. *Hepcidin regulation in wild-type and Hfe knockout mice in response to alcohol consumption: evidence for an alcohol-induced hypoxic response*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 33, 1391-400.
- IQBAL T., DIAB A., WARD D. G., BROOKES M. J., TSELEPIS C., MURRAY J., ELIAS E., 2009. *Is iron overload in alcohol-related cirrhosis mediated by hepcidin?* World J. Gastroenterol. 15, 5864-5866.
- KEEL S. B., DOTY R. T., YANG Z., QUIGLEY J. G., CHEN J., KNOBLAUGH S., KINGSLEY P. D., DE DOMENICO I., VAUGHN M. B., KAPLAN J., PALIS J., ABKOWITZ J. L., 2008. *A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis*. Science 319, 825-828.
- KIKUCHI G., YOSHIDA T., NOGUCHI M., 2005. *Heme oxygenase and heme degradation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 558-567.
- KRAUSE A., NEITZ S., MÄGERT H. J., SCHULZ A., FORSSMANN W. G., SCHULZ-KNAPPE P., ADERMANN K., 2000. *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett. 480, 147-150.
- LIPPI G., FRANCHINI M., FAVALORO E. J., TARGHER G., 2010. *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. Semin. Thromb. Hemost. 36, 59-70.
- LIU H., COLAVITTI R., ROVIRA I., FINKEL T., 2005. *Redox-dependent transcriptional regulation*. Circ. Res. 97, 967-974.
- MCKIE A. T., BARROW D., LATUNDE-DADA G. O., ROLFS A., SAGER G., MUDALY E., MUDALY M., RICHARDSON C., BARLOW D., BOMFORD A., PETERS T. J., RAJA K. B., SHIRALI S., HEDIGER M. A., FARZANEH F., SIMPSON R. J., 2001. *An iron regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science 291, 1755-1759.
- MIRANDA-MENDEZ A., LUGO-BARUQUI A., ARMENDARIZ-BORUNDA J., 2010. *Molecular basis and current treatment for alcoholic liver disease*. Int. J. Environ. Res. Publ. Health 7, 1872-88.
- NEMETH E., 2008. *Iron regulation and erythropoiesis*. Curr. Opin. Hematol. 15, 169-175.
- NEMETH E., GANZ T., 2009. *The role of hepcidin in iron metabolism*. Acta. Haematol. 122, 78-86.
- NEMETH E., TUTTLE M. S., POWELSON J., VAUGHN M. B., DONOVAN A., WARD D. M., GANZ T., KAPLAN J., 2004. *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science 306, 2090-2093.
- NICOLAS G., BENNOUN M., DEVAUX I., BEAUMONT C., GRANDCHAMP B., KAHN A., VAULONT S., 2001. *Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8780-8785.
- NICOLAS G., BENNOUN M., PORTEU A., MATIVET S., BEAUMONT C., GRANDCHAMP B., SIRITO M., SAWADOGO M., KAHN A., VAULONT S., 2002a. *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4596-4601.
- NICOLAS G., CHAUVET C., VIATTE L., DANAN J.L., BIGARD X., DEVAUX I., BEAUMONT C., KAHN A., VAULONT S., 2002b. *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J. Clin. Invest. 110, 1037-1044.
- PARK C. H., VALORE E. V., WARING A. J., GANZ T., 2001. *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J. Biol. Chem. 276, 7806-7810.
- PEYSSONNAUX C., ZINKERNAGEL A. S., SCHUEPBACH R. A., RANKIN E., VAULONT S., HAASE V. H., NIZET V., JOHNSON R. S., 2007. *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. J. Clin. Invest. 117, 1926-1932.
- PIETRANGELO A., 2010. *Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Gastroenterology 139, 393-408.
- PIGEON C., ILYIN G., COURSELAUD B., LEROYER P., TURLIN B., BRISOT P., LORÉAL O., 2001. *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload*. J. Biol. Chem. 276, 7811-7819.
- PONKA P., LOK C. N., 1999. *The transferrin receptor: role in health and disease*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31, 1111-1137.
- ROETTO A., PAPANIKOLAOU G., POLITOU M., ALBERTI F., GITRELLI D., CHRISTAKIS J., LOUKOPOULOS D., CAMASCHELLA C., 2003. *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat. Genet. 33, 21-22.
- ROUAULT T. A., 2003. *Hepatic iron overload in alcoholic liver disease: why does it occur and what is its role in pathogenesis?* Alcohol 30, 103-106.
- ROY C. N., ANDREWS N. C., 2005. *Anemia of inflammation: the hepcidin link*. Curr. Opin. Hematol. 12, 107-111.
- SHAYEGHI M., LATUNDE-DADA G. O., OAKHILL J. S., LAFTAH A. H., TAKEUCHI K., HALLIDAY N., KHAN Y., WARLEY A., MCCANN F. E., HIDER R. C., FRAZER D. M., ANDERSON G. J., VULPE C. D., SIMPSON R. J., MCKIE A. T., 2005. *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell 122, 789-801.
- SIKORSKA K., BIELAWSKI K. P., ROMANOWSKI T., STALKE P., 2006. *Hereditary hemochromatosis: the most frequent inherited human disease*. Postepy Hig. Med. Dośw. 6, 667-676.
- VERGA FALZACAPPA M. V., VUJIC SPASIC M., KESSLER R., STOLTE J., HENTZE M. W., MUCKENTHALER M. U., 2007. *STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation*. Blood 109, 353-358.
- VIATTE L., VAULONT S., 2009. *Hepcidin, the iron watcher*. Biochimie 91, 1223-1228.
- VULPE C. D., KUO Y. M., MURPHY T. L., COWLEY L., ASKWITH C., LIBINA N., GITSCHIER J., ANDERSON

- G. J., 1999. *Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse*. Nat. Genet. 21, 195-199.
- WEINBERG E. D., 1996. *Iron withholding: a defense against viral infections*. Biometals 9, 393-399.
- WEISS G., 2009. *Iron metabolism in the anemia of chronic disease*. Biochim. Biophys. Acta 1790, 682-693.
- WHO, 2004. *Global Status Report on Alcohol 2004*. Dept. Mental Health and Substance Abuse, Geneva, Switzerland, 88.
- WRIGHTING D. M., ANDREWS N. C., 2006. *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. Blood 108, 3204-3209.