

Received: 2015.07.17
Accepted: 2016.02.25
Published: 2016.06.30

Zaburzenie homeostazy żelaza w stwardnieniu zanikowym bocznym*

Misregulation of iron homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis

Anna Gajowiak, Agnieszka Styś, Rafał R. Starzyński, Robert Staroń, Paweł Lipiński

Zakład Biologii Molekularnej, Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Streszczenie

Żelazo jest niezbędne wszystkim komórkom w organizmach ssaków, ale w nadmiarze może być dla nich toksyczne. Mimo znaczącego postępu wiedzy dotyczącej mechanizmów komórkowej i ogólnoustrojowej homeostazy żelaza, jaki dokonał się w minionych 15 latach, molekularne podstawy regulacji metabolizmu żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oczekują na wyjaśnienie. Słabo są poznane mechanizmy przemieszczania żelaza w OUN oraz sygnalizacji jego transportu przez bariery krew-mózg oraz krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, które oddzielają OUN od układu krążenia. Wiadomo jednak, że nadmiar żelaza będący skutkiem deregulacji metabolizmu tego mikroelementu odgrywa rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, a wśród nich w rozwoju stwardnienia zanikowo bocznego (ALS). ALS jest postępującą patologią, która charakteryzuje się selektywną dysfunkcją neuronów ruchowych w korze mózgowej i w rdzeniu kręgowym. Patogeneza ALS ma złożony charakter, a jednym z czynników biorących w niej udział jest stres oksydacyjny, który narusza komórkową homeostazę żelaza i zwiększa natężenie choroby. O roli żelaza w rozwoju ALS świadczą pozytywne wyniki terapii polegającej na chelatowaniu tego mikroelementu w mysich modelach ALS. Modele te są przydatne w badaniu molekularnych mechanizmów zaburzenia metabolizmu żelaza w neuronach. Są to najczęściej transgeniczne gryzonie, nosiciele zmutowanego ludzkiego genu dysmutazy nadtlenkowej 1 (SOD1). Mutacje m.in. w tym genie stanowią genetyczne podłoże występowania dziedzicznej postaci ALS u ludzi. Wykorzystując jednak te modele zwierzęce w badaniach nad ALS należy mieć na względzie, że nadekspresja zmutowanego genu *SOD1* u myszy i szczurów przeważnie zwiększa aktywność enzymatyczną SOD1, a to zjawisko nie występuje w ludzkiej patologii i samo przez się może prowadzić do zmian w ekspresji genów metabolizmu żelaza.

Słowa kluczowe:

ALS • mózg • żelazo • neuron ruchowy • neurodegeneracja • stres oksydacyjny • SOD1 • rdzeń kręgowy

Summary

Iron is essential for all mammalian cells, but it is toxic in excess. Our understanding of molecular mechanisms ensuring iron homeostasis at both cellular and systemic levels has dramatically increased over the past 15 years. However, despite major advances in this field, homeostatic regulation of iron in the central nervous system (CNS) requires elucidation. It is unclear how iron moves in the CNS and how its transfer to the CNS across the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers, which separate the CNS from the systemic circulation, is regulated. Increasing evidence indicates the role of iron dysregulation in neuronal cell death observed in neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). ALS is a progressive neurodegenerative disorder characterized by selective cortical

*Artykuł opracowano w ramach projektu nr 2011/01/B/NZ3/00632 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

	and spinal motor neuron dysfunction that results from a complex interplay among various pathogenic factors including oxidative stress. The latter is known to strongly affect cellular iron balance, creating a vicious circle to exacerbate oxidative injury. The role of iron in the pathogenesis of ALS is confirmed by therapeutic effects of iron chelation in ALS mouse models. These models are of great importance for deciphering molecular mechanisms of iron accumulation in neurons. Most of them consist of transgenic rodents overexpressing the mutated human superoxide dismutase 1 (<i>SOD1</i>) gene. Mutations in the <i>SOD1</i> gene constitute one of the most common genetic causes of the inherited form of ALS. However, it should be considered that overexpression of the <i>SOD1</i> gene usually leads to increased SOD1 enzymatic activity, a condition which does not occur in human pathology and which may itself change the expression of iron metabolism genes.
Keywords:	ALS • brain • iron • motor neuron • neurodegeneration • oxidative stress • SOD1 • spinal cord
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1208036
Word count:	5419
Tables:	–
Figures:	1
References:	116

Adres autora: prof. dr hab. Paweł Lipiński, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, ul. Postępu 36a, 05-552 Magdalenka; e-mail: p.lipinski@ighz.pl

Wykaz skrótów: **ALS** – stwardnienie zanikowe boczne (amyotrophic lateral sclerosis), **BBB** – bariera krew-mózg (blood-brain barrier), **BCSF** – bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (blood-cerebrospinal fluid barrier), **Cp** – ceruloplazmina, **DCYTB** – dwunastniczy cytochrom b, **DMT1** – transporter metali dwuwartościowych 1, **Fpn** – ferroportyna, **Ft** – ferrytyna, **IRE** – iron responsive element, **IRP** – iron regulatory protein, **NTBI** – żelazo niezwiązane z transferyną (non-transferrin bound iron), **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy, **SOD1** – dysmutaza ponadtlenkowa 1 (superoxide dismutase 1), **Tf** – transferyna, **TfR1** – receptor transferyny 1 (transferrin receptor 1).

WSTĘP

Właściwości oksydoredukcyjne jonów żelaza są wykorzystywane w wielu reakcjach biochemicznych, na których opierają się podstawowe procesy biologiczne na poziomie komórki, a także w skali całego organizmu. Żelazo jako funkcjonalny element kofaktorów enzymatycznych (koenzymów i grup prostetycznych) przetrwało drastyczną zmianę, która zaszła w chemicznym składzie atmosfery ziemskiej przed około 300 mln lat, polegającą na tym, że w wyniku procesu fotosyntezy u sinic nastąpił wzrost stężenia tlenu, które z czasem osiągnęło poziom 21% [22]. Interakcja tlenu i żelaza oprócz niezaprzeczalnych korzyści dla funkcjonowania organizmów żywych, niesie ze sobą potencjalne zagrożenie, gdyż tlen utleniając jony żelazawe (Fe^{2+}) do jonów żelazowych (Fe^{3+}) bardzo ogranicza rozpuszczalność żelaza w roztworach fizjologicznych (jony Fe^{3+} podlegają hydrolizie i polimeryzacji doprowadzając do powstania bardzo słabo rozpuszczalnych związków chemicznych), a tym samym jego biodostępność. Poza tym jony Fe^{2+} w obecności reaktywnych pochodnych tlenu cząsteczkowego (O_2) katalizują reakcję Fentona, w której powstaje rodnik wodorotlenowy ($\text{OH}\cdot$), charaktery-

zujący się bardzo silnymi właściwościami utleniającymi, reagujący nieswoiście z bardzo dużymi stałymi szybkości reakcji z biomolekułami znajdującymi się w bezpośrednim sąsiedztwie i przez to uważany za najbardziej reaktywną biotoksynę [6]. Korzyści płynące z udziału żelaza w katalizie bioorganicznej zostały utrzymane dzięki powstaniu w toku ewolucji białek tworzących sieć metaboliczną żelaza. Co istotne, system współdziałających ze sobą białek przyczynia się do ograniczenia udziału żelaza w reakcji Fentona. Zapewnienie biodostępności żelaza oraz ograniczenie jego toksyczności to dwa wyznaczniki homeostazy żelaza. W ciągu ostatnich 15 lat wiedza na temat molekularnych podstaw homeostazy żelaza powiększyła się w niespotykanym dotychczas stopniu. Poznano mechanizmy transportu żelaza przez błony biologiczne, regulacji jego stopnia utlenienia, magazynowania, syntezy hemu, biogenezy centrów żelazowo-siarkowych, a także precyzyjnego dostarczania tych kofaktorów do subregionów komórkowych, gdzie są wbudowywane w cząsteczki apoenzymów. Poznano również mechanizmy regulujące zawartość i rozmieszczenie żelaza w komórce i w organizmie. Molekularne podstawy komórkowej i ogólnoustrojowej homeostazy żelaza oraz zaburzenia tych procesów w odpowiedzi na różne czyn-

niki patofizjologiczne były wielokrotnie przedmiotem opracowań [59,60,61,62,63,98,99], w tym artykułów przeglądowych publikowanych na łamach PHMD [59,60,61]. W artykule omówiono zaburzenia metabolizmu żelaza występujące w jednej z najcięższych i jak dotąd nieuleczalnych chorób neurodegeneracyjnych – w stwardnieniu zanikowym bocznym. Deregulacja metabolizmu żelaza prowadząca najczęściej do nadmiernej akumulacji żelaza w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) występuje w wielu chorobach neurodegeneracyjnych o niewyjaśnionej etiologii, takich jak choroba Alzheimera [11], Parkinsona [23], syndrom niespokojnych nóg [3] oraz w chorobach uwarunkowanych genetycznie, takich jak aceruloplasminemia [112], neuroferrytynopatia [17], ataksja Friedreicha [106], czy choroba Huntingtona [7]. Omawiana przez nas patologia występuje pod różnymi terminami. Nawet w polskojęzycznym piśmiennictwie naukowym najbardziej rozpoznawalnym określeniem stwardnienia zanikowego bocznego jest skrót ALS od angielskiej nazwy amyotrophic lateral sclerosis. Używany jest również skrót SLA pochodzący z łaciny (*sclerosis lateralis amyotrophica*). Ponadto, w USA, od 1941 r. używa się określenia choroba Lou Gehriga (od nazwiska popularnego amerykańskiego baseballisty, który zapadł na tę chorobę i zmarł w wyniku jej przebiegu [39]). We Francji ALS występuje pod nazwą choroba Charcota od nazwiska francuskiego lekarza Jeana-Martina Charcota, który w 1869 po raz pierwszy zamieścił jej opis [14]. Według klasyfikacji chorób przyjętej przez WHO, ALS należy do grupy chorób neuronu ruchowego (motor neuron disease). Jest to choroba zwyrodnieniowa (degeneracyjna) występująca u ludzi dorosłych. Prowadzi do względnie wybiórczego uszkodzenia i degeneracji obwodowego (dolnego) i ośrodkowego (górnego) neuronu ruchowego w rdzeniu kręgowym oraz w pniu i korze mózgu, wskutek czego dochodzi do postępującego niedowładu i porażenia (paraliżu) mięśni i do śmierci wskutek porażenia mięśni oddechowych [76]. ALS występuje z częstotliwością około 2 nowych zachorowań na 100 000 osób w ciągu roku [97]. ALS poświęcane są liczne i wszechstronne prace przeglądowe. Obejmują epidemiologię, patofizjologię, patogenezę, diagnostykę, leczenie, modele zwierzęce ALS, a nawet ekonomiczne skutki jego występowania [16,26,30,58,79,88,102]. Inicjacja i rozwój ALS mają niewątpliwie wieloczynnikowe uwarunkowania. Sugeruje się, że ich wspólną podstawą może być mechanizm o charakterze sprzężenia wyprzedzającego, uruchamiający zaburzenie homeostazy RNA i białka prowadzący do nieuchronnej degeneracji neuronów ruchowych [58].

W artykule skupiono się na omówieniu deregulacji metabolizmu żelaza w ALS jako istotnym, chociaż nie głównym elemencie patogenezы tej choroby. Jak dotychczas wyrywkowe informacje na ten temat można znaleźć w artykułach przeglądowych dotyczących roli żelaza w chorobach neurodegeneracyjnych [32,82]. Punktem wyjścia do omówienia zaburzenia homeostazy żelaza w ALS będzie synteza dotycząca molekularnych podstaw obrotu tego mikroelementu w OUN.

ŻELAZO W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM (OUN)

Powszechnie wiadomo, że niedobór żelaza jest najczęściej występującym niedoborem żywieniowym u ludzi [15] i jest główną przyczyną niedokrwistości [54]. Jest to zrozumiałe ze względu na to, że około 70% żelaza zawartego w organizmie wchodzi w skład hemoglobiny erytrocytów krwi obwodowej, a także ich prekursorów w szpiku kostnym oraz że synteza hemu niezbędna do prawidłowego przebiegu erytropoezy pochłania prawie całą dobową jego podaż w organizmie [4]. O wiele mniej wiadomo, że niedobór żelaza występujący u ludzi w okresie niemowlęcym wpływa na zaburzenie rozwoju mózgu i jego funkcje w dalszym okresie życia, które nie zanikają nawet po skorygowaniu w wyniku zastosowania suplementacji preparatami żelaza [8,64,65]. Oznacza to, że do prawidłowego funkcjonowania mózgu wymagana jest ciągłość dostarczenia odpowiedniej ilości żelaza we wczesnej, neonatalnej fazie rozwoju osobniczego. U dzieci w wieku szkolnym do najbardziej znaczących neurologicznych objawów niedoboru żelaza w wieku niemowlęcym zalicza się trudności w uczeniu się, obniżone zdolności poznawcze, problemy wychowawcze [29,83]. Przypuszcza się, że podłożem tych zjawisk jest hipomielinizacja, zaburzenie procesu mielinizacji, czyli wytwarzania otoczki mielinowej wokół włókien nerwowych w mózgu i rdzeniu przedłużonym [65,83]. Za ten proces są odpowiedzialne komórki gleju – oligodendrocyty [101], które uważa się za komórki o najbardziej intensywnym metabolizmie energetycznym wśród komórek OUN. Wiąże się to z dużą aktywnością żelazozależnych enzymów łańcucha oddechowego, uczestniczących w wytwarzaniu ATP i decyduje o szczególnej wrażliwości oligodendrocytów na niedobór żelaza. Ponadto aktywność enzymów biorących udział w syntezie cholesterolu i kwasów tłuszczowych, prekursorów mieliny, jest determinowana przez kofaktory zawierające jony żelaza [12].

Na przeciwnym biegunie zaburzeń homeostazy żelaza w OUN jest nadmierna jego akumulacja w różnych strukturach mózgu, a także w różnych typach komórek OUN. Stres oksydacyjny, który nasila się w obecności niezwiązanych z białkami jonów żelaza odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu wyżej wymienionych chorób neurodegeneracyjnych. Ogólnoustrojowe przeciążenie organizmu żelazem występujące np. w hemochromatozie, genetycznej chorobie związanej z nadmierną absorpcją żelaza z diety, nie ma odzwierciedlenia w podwyższonym stężeniu żelaza w OUN [27], co sugeruje, że homeostaza żelaza w OUN charakteryzuje się daleko posuniętą autonomią. W tym kontekście wiedza na temat molekularnych podstaw homeostazy żelaza w OUN, a szczególnie molekularnych mechanizmów transportu żelaza z układu krążenia do OUN jest niezwykle istotna dla zrozumienia roli żelaza w patogenezie ALS.

Dostarczenie żelaza do OUN wymaga przekroczenia jednej z 2 barier komórkowych: bariery krew-mózg (blood-brain barrier, BBB) lub bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (blood-cerebrospinal fluid barrier,

BCSFB) [70,90,91,92]. BBB utworzona jest przez ściśle do siebie przylegające komórki śródbłonna naczyń włosowatych. Komórki śródbłonkowe w BBB są komórkami spolaryzowanymi (podobnie jak enterocyty absorpcyjne, poprzez które odbywa się transport żelaza z przewodu pokarmowego do krwi). Przeciwnie fragmenty ich błon komórkowych kontaktują się z krwią – część apikalna (luminal) oraz z płynem wypełniającym przestrzeń między komórkami mózgu (interstitial fluid) – część bazolateralna (abluminal). Konstrukcję BBB wzmacniają i uszczelniają perycyty, komórki podobne do komórek mezenchymalnych, które mogą być wbudowywane w sieć naczyń włosowatych, u podstawy komórki śródbłonna na wysokości połączeń międzykomórkowych [53]. Od strony OUN, w tworzeniu BBB uczestniczą astrocyty, największe komórki glejowe, które kontaktują się z komórkami śródbłonkowymi naczyń włosowatych za pomocą wypustek określanych jako stopki ssące (endfeet) [70]. BCSFB występuje na obszarze spłotu naczyńiówkowego (choroid plexus), struktury wytwarzającej płyn mózgowo-rdzeniowy, występującej w prawie wszystkich częściach układu komorowego mózgowia, w postaci węzłów naczyń włosowatych wpuklonych do światła komór mózgowych [92]. W przeciwieństwie do komórek śródbłonna naczyniowego w obrębie BBB, komórki śródbłonkowe spłotu naczyńiówkowego są rozdzielone (zjawisko fenestracji), co pozwala na swobodny przepływ substancji rozpuszczonych w surowicy krwi. Właściwą barierą komórkową w splocie naczyńiówkowym są ependymocyty (komórki ependymy, czyli wyściółki – warstwy pokrywającej ściany komór mózgu, a także kanału środkowego rdzenia kręgowego), które są typem komórek glejowych, zawierających liczne mikrosomki na powierzchni zwróconej do światła komór [46].

Głównym nośnikiem jonów żelaza do wszystkich komórek organizmu, w tym do komórek OUN jest transferyna (Tf), białko syntetyzowane głównie w hepatocytach i uwalniane do krwi. Jedna cząsteczka Tf wiąże dwa jony żelazowe z powinowactwem 10^{22}M^{-1} w pH 7,4 [1]. Transport jonów żelaza związanych z Tf do komórek śródbłonna naczyniowego BBB odbywa się w procesie endocytozy za pośrednictwem receptora transferyny 1 (TfR1), który występuje na błonie apikalnej komórek śródbłonkowych jako homodimer, do którego wiążą się 2 cząsteczki holotransferyny [70]. Jest to typowy i najbardziej rozpowszechniony w komórkach ssaków szlak pobierania żelaza. Następnym jego etap – transport jonów żelaza z endosomu (po ich uwolnieniu z Tf w kwaśnym środowisku endosomu i redukcji do jonów Fe^{2+}) do cytoplazmy komórek śródbłonna – odbywa się z udziałem transportera metali dwuwartościowych (DMT1) i nie jest już powszechnie akceptowany przez badaczy [75,95]. Cytosol jest punktem wyjściowym, z którego żelazo jest pobierane do syntezy hemu i centrów żelazowo-siarkowych (w cytoplazmie i mitochondriach) w celu utrzymania aktywności enzymów uczestniczących w wielu procesach metabolicznych komórek śródbłonna. Część żelaza, szczególnie jego nadmiar, może być magazynowana w ferrytynie, białku, którego cząsteczka może

związać ponad 4 000 atomów tego pierwiastka [38]. Większość żelaza pobrana przez komórki śródbłonna naczyniowego jest transportowana przez błonę podstawną do płynu międzykomórkowego w OUN. W większości komórek ssaków rolę jedyne go transportera żelaza do środowiska pozakomórkowego pełni ferroportyna [110]. W procesie uwalniania żelaza z komórek ferroportyna współdziała z zawierającymi jony miedzi ferrooksydazami, ceruloplazminą (Cp) (w makrofagach układu siateczkowo-śródbłonkowego) [77] i hefajstyną (w enterocytach absorpcyjnych w dwunastnicy) [86], które utleniają jony Fe^{2+} do jonów Fe^{3+} , aby te ostatnie mogły być przyłączone do apo-Tf. Obecność ferroportyny w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych BBB różnych gatunków ssaków jest dobrze udokumentowana [70]. Wydaje się, że w tych komórkach ferroportyna współdziała jednocześnie z tymi dwoma ferrooksydazami. Pierwszą z nich jest hefajstyna, którą zlokalizowano na błonie bazolateralnej komórek śródbłonna naczyniowego BBB [68]. Usunięcie hefajstyny z błony komórkowej hodowanych *in vitro* komórek śródbłonna naczyniowego, przez ograniczenie biodostępności miedzi, całkowicie hamowało transport żelaza z tych komórek [68]. Upośledzona funkcja hefajstyny jest często rekompensowana przez podwyższoną ekspresję i aktywność ferrooksydazową Cp. Zjawisko to obserwowano w hodowlach oligodendrocytów pozyskanych od noworodków myszy niosących mutację genu *hefajstyny* (sex-linked anemia, sla) [94]. W wyniku procesu alternatywnego składania genu Cp na bazie jednego pre-mRNA powstają dwa transkrypty: 1) kodujący postać rozpuszczalną Cp (soluble ceruloplasmin, sCp), która jest uwalniana do środowiska pozakomórkowego; 2) kodujący postać błonową Cp (GPI-Cp), która jest zakotwiczona na błonie komórkowej przez glikozylofosfatydyloinozylol (glycosyl phosphatidylinositol, GPI) [85]. sCp występuje w płynie międzykomórkowym w OUN i jest tam prawdopodobnie uwalniana przez komórki śródbłonna naczyniowego i przez astrocyty [70]. Sugeruje się, że może uczestniczyć w procesie utleniania jonów Fe^{2+} transportowanych poprzez BBB do OUN. Ponadto, w procesie może uczestniczyć GPI-Cp występująca na błonie astrocytów, które pozostają w ścisłym kontakcie z komórkami śródbłonna naczyniowego BBB. Trzecim białkiem, które wspomaga transport żelaza z tych komórek jest białko prekursorowe β -amyloidu (amyloid- β precursor protein, APP). Wykazano, że APP wchodzi w bezpośrednią interakcję z ferroportyną i stymuluje wypływ żelaza z komórek [20]. Początkowo sugerowano, że APP ma aktywność ferrooksydazową [20], ale hipoteza została odrzucona [21]. Wyniki ostatnich badań wskazują na rolę APP w stabilizowaniu ferroportyny na błonie podstawno-bocznej komórek śródbłonna naczyniowego BBB [111].

Utlenione żelazo jest wiązane przez apotransferynę (apo-Tf), która w OUN jest syntetyzowana przez oligodendrocyty i uwalniana do płynu międzykomórkowego [56]. Apo-Tf syntetyzują również astrocyty [114]. Stężenie Tf w płynie międzykomórkowym OUN jest 10-krotnie mniejsze od stężenia Tf w surowicy krwi [91]. Ponadto

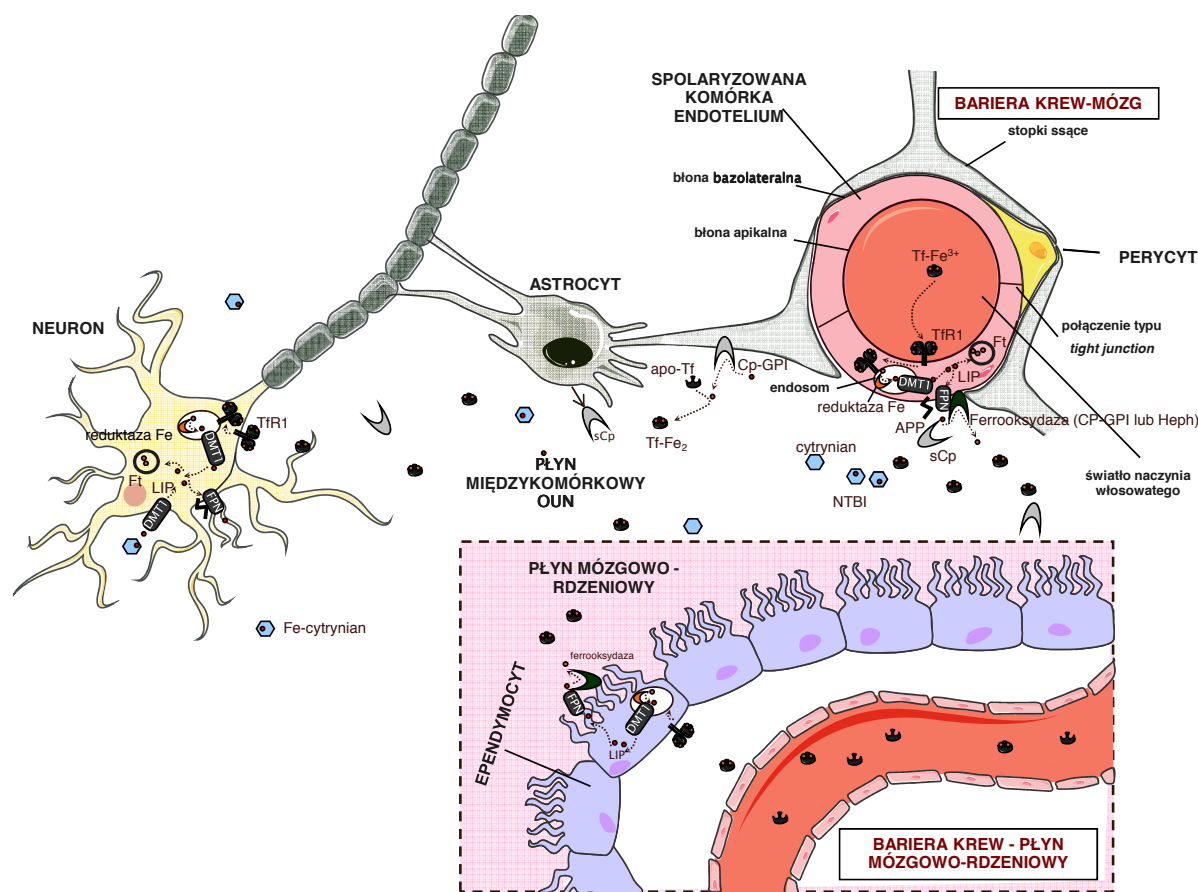
jest niemal całkowicie wysycona jonami żelaza (fizjologiczne wysycenie Tf surowicy krwi wynosi 30-40%). W tej sytuacji niektórzy autorzy sugerują, że w płynach OUN występuje żelazo niezwiązane z Tf (nontransferin-bound iron, NTBI), które może tworzyć kompleksy z niskocząsteczkowymi związkami np. z cytrynianem [56,70,100]. NTBI jest postacią żelaza, która nie występuje w warunkach fizjologicznych w surowicy krwi (ze względu na dużą rezerwę apo-Tf). Może natomiast się pojawiać w stanach patologicznych związanych z przeciążeniem organizmu żelazem i uważane jest za postać toksyczną, gdyż jego pobieranie przez komórki pozostaje poza kontrolą molekularnych wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulatorowych [10]. Niektórzy autorzy nie wykluczają, że w przeciwieństwie do neuronów, które pobierają żelazo głównie w postaci kompleksu Tf-Fe₂ poprzez TfR1 i DMT1 [74], NTBI może być źródłem żelaza komórek charakteryzujących się niską ekspresją TfR1, takich jak oligodendrocyty [99].

Rola spłotu naczyńiówkowego jako struktury biorącej udział w transporcie żelaza z układu krążenia do OUN była początkowo niedoceniana, głównie dlatego, że powierzchnię chłonną tej struktury szacowano na około 50% powierzchni chłonnej komórek w BBB [48]. Dokładne badania wykazały jednak, że z powodu obecności mikrokosmków w ependymocytach całkowita powierzchnia komórek spłotu jest 10-krotnie większa niż pierwotnie szacowano [96]. Ponadto przepływ krwi przez naczynia spłotu naczyńiówkowego jest o około 5 razy większy niż przez naczynia BBB [66]. W świetle tych danych transport żelaza do OUN przez BCSFB nabiera istotnego znaczenia. Potwierdzają to również badania molekularne. Metodą hybrydyzacji *in situ* zlokalizowano w splocie naczyńiówkowym kompletny zestaw białek potencjalnie aktywnych w transporcie żelaza przez bipolarnie komórki: TfR1, DMT1, ferroportynę i ceruloplazminę, hefajstynę i ferrireduktazę – Dcytb (duodenal cytochrome b) [91], enzym, który zidentyfikowano po raz pierwszy na błonie apikalnej enterocytów absorpcyjnych dwunastnicy [72]. Białka te nie zostały wykryte w naczyniach włosowatych spłotu [92].

Regulacja transportu żelaza do OUN jest stosunkowo mało poznanym zagadnieniem. Ilość żelaza transportowanego do mózgu zmienia się w zależności od okresu postnatalnego rozwoju osobniczego: jest niska tuż po urodzeniu, zwiększa się we wczesnym okresie neonatalnym, następnie maleje i przez długo ustala się na niskim poziomie. U szczura fazy te przypadają na 1 dzień po urodzeniu (nikły transport żelaza do mózgu), okres między 1 a 14 dniem po urodzeniu, w którym następuje gwałtowny wzrost (z maksimum przypadającym właśnie na 14 dzień), a następnie równie gwałtowny spadek [70]. Na podstawie badań przeprowadzonych na szczurach McCarthy i Kosman zaproponowali model, według którego ilość żelaza transportowanego do mózgu w tych okresach zależy od ewoluującej interakcji między komórkami śródbłónki naczyń włosowatych tworzących BBB a astrocytami, od ekspresji białek stymulujących

uwalnianie żelaza przez BBB (hefajstyna, GPI-Cp i sCp) [70] oraz od zmieniającej się w tych komórkach ekspresji hepcydyny (peptydu hamującego przepływ żelaza przez BBB). Hepcydyna od 15 lat jest uznanym regulatorem ogólnoustrojowej homeostazy żelaza [49,59]. Syntetyzowana głównie w hepatocytach, jest uwalniana do krwi, wiąże się z ferroportyną występującą na błonie komórkowej enterocytów absorpcyjnych i makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego i indukuje degradację tego białka, ograniczając absorpcję żelaza oraz jego przekierowanie do krwi przez makrofagi [49,59]. Nie ma dowodów wskazujących na udział hepcydyny cyrkulującej w surowicy krwi w regulacji przepływu żelaza przez BBB. Należy jeszcze raz podkreślić, że poza okresem neonatalnym zawartość żelaza w mózgu w niewielkim tylko stopniu zależy od ogólnoustrojowego statusu żelaza [90,91,92]. Jednak gen *Hamp*, kodujący hepcydynę, ulega ekspresji w wielu strukturach mózgu i rdzenia kręgowego myszy [81,116]. Ponadto ekspresję hepcydyny na poziomie białka stwierdzono zarówno w neuronach jak i komórkach glejowych [116]. Badania *in vitro* w systemie kokultur komórkowych wykazały, że obniżenie ekspresji ferroportyny na błonie ludzkich komórek śródbłónki naczyńiowego BBB było skutkiem działania hepcydyny uwalnianej przez astrocyty [69]. Urrutia i wsp. wykazali, że stan zapalny indukuje ekspresję genu *Hamp* właśnie w astrocytach i komórkach mikrogleju (ale nie w neuronach) pobranych z mózgu szczura [104]. U myszy z nokautem genu *Hamp* stwierdzono podwyższone stężenie ferroportyny w komórkach śródbłónki naczyń BBB [34]. Mimo tych informacji rola hepcydyny syntetyzowanej w OUN w regulacji transportu żelaza przez BBB i przez BCSFB oraz w uwalnianiu żelaza przez poszczególne typy komórek OUN pozostaje nieznana. Schemat transportu żelaza przez bariery krew-mózg (BBB) i krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (BCSF) oraz cyrkulacja żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) przedstawiono na rycinie 1.

Wiadomo, że w komórkach nerwowych wszystkich typów, podobnie jak we wszystkich komórkach ssaków, funkcjonuje potranskrypcyjny mechanizm regulujący wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, pozostający pod kontrolą białek IRP1 i IRP2 (iron regulatory proteins) [99]. Białka te w zależności od statusu żelaza w komórce (niedoboru lub nadmiaru) w sposób skoordynowany regulują procesy transportu żelaza do komórki, jego magazynowania oraz usuwania poza komórkę [60,99]. Celem regulacji jest zapewnienie biodostępności tego mikroelementu w komórce oraz ograniczenia toksyczności. Wydaje się, że kontrola metabolizmu żelaza w poszczególnych komórkach nerwowych przez białka IRP może również odgrywać istotną rolę w obrocie żelaza w OUN (regulacja ilości żelaza uwalnianego przez jedne komórki oraz pobierania przez inne). W ogólnoustrojowym metabolizmie żelaza taką rolę pełnią białka IRP w enterocytach i makrofagach. Dla regulacji metabolizmu żelaza w mózgu szczególne znaczenie może mieć IRP2, gdyż na podstawie przekrojowej analizy ekspresji IRP w tkankach ssaków wykazano, że



Ryc. 1. Transport żelaza przez bariery krew-mózg (BBB) i krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (BCSF) oraz cyrkulacja żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Żelazo jest transportowane z krwi obwodowej do OUN przez dwie bariery komórkowe: BBB i BCSF (obramowane linią przerywaną) w postaci kompleksu z transferyną ($Tf-Fe_3$). W transporcie przez barierę BBB uczestniczą dwubiegunowe komórki śródbłonnka naczyń włosowatych (endotelium), natomiast w transporcie przez BCSF uczestniczą komórki ependymy wyposażone w mikrokosmki (struktury należące do OUN). Specyficzna rola każdego z tych dwóch różnych szlaków dostarczania żelaza do OUN jest nieznana. Molekularny mechanizm transportu opiera się na receptorze transferyny 1 (TfR1), transporterze metali dwuwartościowych 1 (DMT1), ferroportynie (FPN) oraz na miedziozależnych ferooksydazach (mogą to być ceruloplazmina występująca w dwóch postaciach: błonowej – GPI-Cp i rozpuszczalnej – sCp oraz hefajstyna – Heph). W eksporcie żelaza z endotelium do płynu międzykomórkowego OUN uczestniczy również białko prekursorowe β -amyloidu (APP). Białkiem transportującym żelazo do komórek OUN (astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów) jest cyrkulująca w płynie międzykomórkowym transferyna (Tf) syntetyzowana przez oligodendrocyty (czego nie zaznaczono na rycinie). Jest ona całkowicie wysyciona żelazem, tak więc żelazo, które nie może być do niej przyłączone, występuje w kompleksach z niskocząsteczkowymi związkami np z cytrynianem. Żelazo to tworzy tzw. pulę żelaza niezwiązanego z transferyną (NTBI). Współdziałanie poszczególnych komórek w przemieszczaniu żelaza w obrębie OUN nie jest dostatecznie poznane. Astrocyty kontaktują się z komórkami endotelium przez tzw. stopki ssące. Cp-GPI występująca na ich błonie komórkowej uczestniczy w transporcie żelaza z komórek śródbłonnka. Neurony mogą pobierać żelazo zarówno w formie $Tf-Fe_3$, jak i w formie kompleksu Fe-cytrynian. Są to komórki wyposażone w pełny zestaw białek niezbędnych do utrzymania wewnątrzkomórkowej homeostazy. Na rysunku zaznaczono najważniejsze z nich: TfR1, DMT1, FPN i ferrytynę (FT). Białka te współdziałają w utrzymaniu optymalnego poziomu żelaza w tzw. labilnej puli żelaza w cytoplazmie (LIP)

najwyższe stężenie IRP2 występuje właśnie w mózgu [41]. Wyniki badań grupy Rouault wykazały także, że chociaż u myszy z nokautem genu *Irp2* (KO IRP2) nie odnotowano zmian w całkowitej zawartości żelaza w mózgu, to jednak brak aktywności IRP2 wpływa na zwiększenie zawartości żelaza w niektórych strukturach mózgu (które wyszczególniono w [60]) oraz na występowanie zmian neurodegeneracyjnych objawiających się zaburzeniem koordynacji ruchowej [55]. Autorzy sugerują, że bezpośrednią przyczyną degeneracji komórek nerwowych u myszy KO IRP2 może być, paradoksalnie, tzw. funkcjonalny niedobór żelaza. Oznacza

to, że żelazo w tych komórkach jest związane głównie z ferrytyną (stąd detekcja złogów żelaza w postaci ferrytyny stwierdzona w preparatach mózgu myszy KO IRP2), której niekontrolowana synteza, z powodu braku głównego represora tego procesu, jakim w mózgu jest IRP2, prowadzi do drastycznego ograniczenia biologicznej dostępności żelaza i zakłócenia przebiegu reakcji biochemicznych związanych z aktywnością jonów tego metalu [44]. Należy podkreślić, że badania Galy'ego i wsp. [25] prowadzone na innym modelu myszy KO IRP2, nie potwierdziły obserwacji dotyczących zmian neurodegeneracyjnych opisanych przez bada-

czy z grupy Rouault [55]. W świetle tej kontrowersji rola białek IRP, a szczególnie IRP2, w utrzymaniu homeostazy żelaza w OUN wciąż oczekuje na wyjaśnienie.

Regulacja metabolizmu żelaza w OUN pozostaje ciągle procesem kryjącym wiele tajemnic. Słabo poznane są mechanizmy obrotu żelaza w OUN i jego dystrybucji między różnymi strukturami mózgu. Niewyjaśnione pozostają mechanizmy preferencyjnej akumulacji żelaza z wiekiem (u człowieka począwszy od 3 dekady życia) w takich strukturach mózgu jak istota czarna (*substantia nigra*), skorupa (*putamen*), jądro ogoniaste (*caudate nucleus*) [35,37,40,87,115], czy gałka biała (*globus pallidus*), w której stężenie żelaza jest porównywalne z zawartością żelaza w wątrobie, gdzie są magazynowane jego rezerwy na potrzeby całego organizmu [90]. Nieznane są mechanizmy współdziałania najważniejszych komórek w OUN: neuronów, oligodendrocytów, astrocytów i komórek mikrogleju w regulacji metabolizmu żelaza. Identyfikacja komórek odpowiedzialnych za syntezę hepcydyny w OUN oraz mechanizmów regulujących ten proces byłaby niewątpliwie istotnym krokiem w poznaniu regulacji molekularnych szlaków transportu żelaza do OUN, ale również przepływu żelaza między komórkami różnych typów występujących w OUN. Poza tym istotne byłoby poznanie współdziałania osi regulowanej hepcydyna-ferroportyna z systemem IRP/IRE. Poznania wymagają również molekularne mechanizmy zwrotnego transportu żelaza z mózgu do układu krążenia i ich regulacja. Wszystkie wymienione regulacje są niewątpliwie niezbędne do utrzymania homeostazy żelaza w OUN.

ZABURZENIE METABOLIZMU ŻELAZA U PACJENTÓW Z ALS ORAZ W MYSICH I KOMÓRKOWYCH MODELACH ALS

Występowanie zaburzenia metabolizmu żelaza stwierdzono zarówno u pacjentów z ALS, jak i na modelach zwierzęcych tej patologii. O ile jednak analizy żelaza u chorych na ALS dotyczą osób ze sporadyczną postacią ALS (na ogół o nieznannej etiologii), o tyle w badaniach metabolizmu żelaza na modelach zwierzęcych zdecydowanie dominują myszy, nosiciele zmutowanego ludzkiego genu *SOD1* (najczęściej *SOD1^{G93A}* i *SOD1^{G37R}*). U pacjentów z ALS prawidłowością jest podwyższenie wartości biochemicznych parametrów żelaza w surowicy krwi oraz zmiany stężenia markerów białkowych wskazujących na zaburzenia o charakterze nadmiaru żelaza. Dotyczy to podwyższonego stężenia żelaza w surowicy [107], zwiększonego wysycenia transferyny surowicy krwi jonami żelaza, podwyższonego stężenia ferrytyny [28,43,73,78,107,113] oraz obniżonego stężenia transferyny [45]. W badaniach dużej liczby pacjentów z ALS (n=694), stwierdzono mniejszą przeżywalność (o około 300 dni) chorych z grupy o wyższym stężeniu ferrytyny w porównaniu do chorych wykazujących niższe stężenie tego białka [78]. Inne badania wykazały natomiast, że postęp w rozwoju ALS jest pozytywnie skorelowany ze stężeniem ferrytyny w surowicy [43]. Na podstawie monitorowania stężeń ferrytyny i transferyny w surowicy

w krwi możliwe jest odróżnienie z 82% dokładnością chorych na ALS od zdrowych osobników [73]. Choć w diagnostyce stężenie ferrytyny jest zwykle postrzegane jako typowy marker wskazujący na zawartość żelaza w wątrobie, to jednak interpretując wysokie wartości ferrytyny w surowicy krwi należy wykluczyć występowanie stanu zapalnego, który wpływa na podniesienie stężeń ferrytyny niezależnie od stanu rezerw żelaza w organizmie [109]. Stan zapalny został wykluczony jako przyczyna podwyższonego stężenia ferrytyny w surowicy chorych na ALS przez Goodalla i wsp. [28], jednak ciągle bez odpowiedzi pozostaje intrygujące pytanie o źródło podwyższonego stężenia ferrytyny w surowicy krwi pacjentów z ALS. Niewątpliwie tym źródłem nie jest wątroba, organ niewykazujący zmian w metabolizmie żelaza w przebiegu ALS. Wydaje się, że określenie tego źródła rzuciłoby światło na rolę żelaza w patogenezie ALS.

Dzięki zastosowaniu techniki obrazowania metodą rezonansu magnetycznego [93], u pacjentów z ALS wykryto depozyty żelaza w zakręcie przedśrodkowym (*gyrus precentralis*) pierwszorzędowej kory ruchowej [42,52]. Powtórne badania tych samych pacjentów, przeprowadzone po 6 miesiącach wykazały powiększenie depozytów [42]. Wyniki badań przyżyciowych potwierdzono wynikami badań histologicznych *post mortem*, w których zlokalizowano złogi żelaza (barwienie błękitem pruskim – metoda Perlsa) w tych samych strukturach mózgu, w komórkach mikrogleju, w których stwierdzono także podwyższone stężenie ferrytyny [52]. Wzrost zawartości żelaza stwierdzono również w neuronach rdzenia kręgowego, którego próbki pobrano *post mortem* od chorych na ALS [47]). Z wynikami badań świadczących o gromadzeniu się żelaza w korze ruchowej pacjentów z ALS zbiega się sugestia wskazująca na polimorfizm H63D genu *HFE*, jako na czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia tej patologii u ludzi [80]. Białko HFE (białko hemochromatozy) występujące na błonie komórek syntetyzujących hepcydynę (głównie hepatocytów), jest jednym z elementów w szlaku indukcji ekspresji tego peptydu. Mutacje w genie *HFE* – najczęściej występująca mutacja C282Y, ale również mutacja H63D, prowadzą do przemieszczenia białka z błony komórkowej do cytoplazmy, co wiąże się z utratą jego funkcji w szlaku sygnalizacyjnym. Następuje zmniejszenie syntezy hepcydyny, pociągając za sobą zwiększoną absorpcję żelaza z diety i jego nadmierną akumulację w organizmie [2]. W przeciwieństwie do przytoczonych wyników, autorzy ostatnich badań przeprowadzonych wśród dużej grupy chorych na ALS i osobników zdrowych (odpowiednio 3962 i 5047 osób) z 7 krajów europejskich zdecydowanie przekonują, że polimorfizm H63D nie jest czynnikiem ryzyka występowania ALS i wnioskuje o ponowne rozważenie roli HFE w patogenezie ALS [105]. Jako kolejny polimorfizm, który może wpływać na czas trwania choroby u pacjentów ze sporadyczną postacią ALS, typowany jest polimorfizm genu *SLC11A2*, kodującego białko DMT1 [9]. Choć badania metabolizmu żelaza u pacjentów z ALS mają stosunkowo ograniczony zakres, to jednak wyraż-

nie wskazują na rolę żelaza w patogenezie sporadycznej postaci tej choroby.

Modele zwierzęce (mysie i szczurze) ALS stwarzają o wiele większe możliwości badania molekularnych mechanizmów akumulacji żelaza w neuronach ruchowych w ALS. Są to głównie modele, w których transgeniczne gryzonie są nosicielami zmutowanego ludzkiego genu *SOD1*, kodującego dysmutazę ponadtlenkową 1 (SOD1; Cu,Zn-SOD), enzym katalizujący reakcję dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), której produktem jest tlen cząsteczkowy (O_2) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) [71]. Mutacje w genie *SOD1* u ludzi są odpowiedzialne za około ¼ przypadków tzw. postaci rodzinnej ALS (fALS, familial ALS), uwarunkowanej genetycznie, która stanowi zaledwie 10% wszystkich przypadków ALS występujących u ludzi [76]. Dominującą postacią ALS jest tzw. postać sporadyczna ALS (sALS, sporadic ALS), na ogół o nieznanej etiologii. W 1993 r. Rosen i wsp. po raz pierwszy wykazali powiązanie między mutacjami w genie *SOD1* a występowaniem fALS [89]. Obecnie znanych jest co najmniej 160 mutacji w ludzkim genie *SOD1* odpowiedzialnych za występowanie ALS [97]. Chociaż u transgenicznych gryzoni, nosiciele zmutowanego genu *SOD1*, rozwijają się objawy choroby neuronów ruchowych przypominające te występujące u pacjentów z ALS, to jednak modele te mają swoją specyfikę, która nie występuje u chorych na ALS. Polega ona na tym, że transgeniczne zwierzęta poza własnym prawidłowym genem *Sod1*, eksprymują (często w wielu kopiach) zmutowany ludzki gen *SOD1*. Co istotne, większość mutacji genu *SOD1* nie wpływa na aktywność enzymu [103], tak więc transgeniczne zwierzęta z nadekspresją zmutowanego genu charakteryzują się podwyższoną aktywnością SOD1 [103]. W naszych badaniach na myszach z nadekspresją genu *SOD1^{G93A}* (podstawienie glicyny w miejsce alaniny w pozycji 93), utworzonych przez Gurneya i wsp. [31], a skomercjalizowanych przez Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), wykazaliśmy, że aktywność SOD1 we wszystkich analizowanych organach jest kilkakrotnie wyższa od aktywności u myszy kontrolnych [24]. Turner i Talbot zwracają uwagę na niepożądane działania nadekspresji ludzkiego prawidłowego genu *SOD1* u transgenicznych myszy, w tym związane z funkcjonowaniem układu nerwowego [103]. Zwiększona aktywność SOD1 nie występuje w ludzkiej patologii, dlatego na wyniki wskazujące na zmiany w metabolizmie żelaza uzyskane na bazie modeli zwierzęcych ALS należy patrzeć również w kontekście potencjalnej regulacji metabolizmu żelaza przez H_2O_2 , jeden z produktów reakcji katalizowanej przez SOD1. Należy podkreślić, że H_2O_2 , reaktywna pochodna tlenu, jest znanym czynnikiem transkrypcyjnie i potranskrypcyjnie regulującym ekspresję wielu genów metabolizmu żelaza [62]. Ponadto w obecności jonów Fe^{2+} , H_2O_2 może być zredukowany do rodnika OH•, zgodnie z przebiegiem reakcji Fentona.

Powyższe uwagi dotyczące modeli zwierzęcych ALS odnoszą się również do modeli komórkowych, w których komórki, najczęściej wywodzące się z komórek

nowotworowych współczulnego układu nerwowego (neuroblastoma), są transfekowane zmutowanym ludzkim genem *SOD1*. Zwiększoną akumulację żelaza w neuronach ruchowych stwierdzono w dwóch najczęściej badanych mysich modelach ALS, które charakteryzują się zróżnicowanym tempem rozwoju patologii: szybkim – *SOD1^{G93A}* [109] i wolnym – *SOD1^{G37R}* (substytucja glicyny w miejsce argininy w pozycji 46) [45]. U 12-miesięcznych myszy *SOD1^{G37R}* wykazujących symptomy ALS złogi żelaza zlokalizowano w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego w postaci punktowych cytoplazmatycznych inkluzji. W komórkach tych nie stwierdzono ani zwiększonego stężenia cytoplazmatycznej ferrytyny, które zwykle świadczy o podwyższonym statusie żelaza w komórce, ani zwiększonego stężenia TfR1 [45], który ulega ekspresji na błonie komórkowej neuronów i determinuje potencjał transportu żelaza do komórki. Obserwowano natomiast wyraźnie zwiększone stężenie DMT1, co częściowo wyjaśnia molekularny mechanizm gromadzenia żelaza w neuronach ruchowych. Ważną obserwacją poczynioną w tych komórkach jest podwyższone stężenie ferrytyny mitochondrialnej (FtMt) [45], którą zidentyfikowano dopiero w 2001 r. [57]. W przeciwieństwie do wszechobecnej ferrytyny cytoplazmatycznej (wyizolowanej i skrytalizowanej przez Laufbergera w 1936 r. [13]), występowanie FtMt u człowieka i myszy ogranicza się do kilku organów i typów komórek, a wśród nich jej ekspresję na poziomie mRNA i białka stwierdzono w neuronach mózgu i rdzenia kręgowego [57]. Należy dodać, że główna funkcja tego białka polega na ograniczeniu puli labilnego żelaza generującego reakcję Fentona w mitochondriach [57]. Złogi żelaza występują również w komórkach glejowych w rdzeniu kręgowym myszy *SOD1^{G37R}* wykazujących symptomy ALS. W komórkach tych obserwowano zarówno zwiększone stężenie TfR1, jak i ferrytyny, co jednoznacznie określa molekularne mechanizmy transportu żelaza do tych komórek i jego magazynowania. Chociaż badania Jeonga i wsp. [45] nie identyfikują molekularnych mechanizmów akumulacji żelaza w neuronach ruchowych myszy *SOD1^{G37R}*, to jednak ogromną ich zaletą jest określenie ekspresji i lokalizacji komórkowej i subkomórkowej niektórych białek metabolizmu żelaza, a także komórkowej dystrybucji żelaza. Badania Wanga i wsp. na mysim modelu ALS o szybkim postępie choroby (nadekspresja ludzkiego zmutowanego genu *SOD1^{G93A}*) wskazują również na wzrost całkowitego stężenia żelaza w rdzeniu kręgowym transgenicznych myszy w porównaniu do myszy kontrolnych (wzrost 1,5-krotny i 1,8-krotny odpowiednio u myszy 90- i 120-dniowych) [108]. Autorzy stwierdzili również wzrost ekspresji TfR1 (na poziomie białka), ale ponieważ analizę tę przeprowadzono na całkowitych ekstraktach tkankowych otrzymanych z rdzenia kręgowego, wzrostu tego nie można przypisać do danego typu komórek nerwowych w rdzeniu kręgowym [108]. Niewątpliwie ważnym dowodem na udział żelaza w patogenezie ALS w mysich modelach *SOD1^{G93A}* i *SOD1^{G37R}* jest terapeutyczne działanie chelatorów żelaza. Traktowanie myszy *SOD1^{G37R}* lipofilnym chelatorem żelaza SIH (salicyl aldehyde isonicotinoyl hydrazon, hydrazon izotyko-

tynianowy aldehydu salicylowego) poprawiało funkcje lokomotoryczne myszy, ograniczało utratę masy ciała oraz wpływało na przedłużenie życia myszy średnio o 5 tygodni. Analiza histologiczna wykazała większą przeżywalność neuronów rdzenia kręgowego oraz 5-6-krotne zmniejszenie depozytów żelaza w neuronach i komórkach glejowych rdzenia kręgowego [45]. Bardzo podobne efekty terapeutycznego zastosowania innych chelatorów żelaza przenikających do mózgu obserwowano na mysim modelu ALS *SOD1*^{G93A} [51,108].

W ALS poza degeneracją neuronów ruchowych dochodzi do uszkodzenia i dysfunkcji mięśni szkieletowych. Dobrowolny i wsp. wykazali, że selektywna nadekspresja ludzkiego genu *SOD1*^{G93A} w mięśniach szkieletowych myszy doprowadza do występowania stresu oksydacyjnego w komórkach mięśniowych, zaburzenia funkcji mitochondriów i postępującej atrofii mięśni, objawów podobnych do tych, które występują u myszy z ogólnoustrojową nadekspresją tego zmutowanego genu [19]. Występowanie zaburzenia metabolizmu żelaza obserwowano w mięśniach szkieletowych szczurów, nosicieli genu *SOD1*^{G93A} [36,37]. U zwierząt tych stwierdzono podwyższone stężenia podjednostek H- i L-ferrytyny, obserwowano zwiększoną ubikwitynację obu peptydów, co według autorów wskazuje na zaburzenie funkcji ferrytyny jako białka ograniczającego pulę żelaza reaktywnego w reakcji Fentona [36]. Zmiany w ekspresji genów metabolizmu żelaza (H-ferrytyny i ferroportyny) w mięśniach szkieletowych obserwowano już w stadium presymptomatycznym u szczurów *SOD1*^{G93A}, ich skutkiem był wzrost zawartości żelaza w mięśniach [38].

Badania na komórkowych modelach ALS, chociaż nie mają bezpośredniego odniesienia do samej patologii, stanowią interesujący punkt wyjścia do analizy molekularnych mechanizmów patogenezы ALS, w tym analizy mechanizmów deregulacji metabolizmu żelaza w ALS. Hadzhieva i wsp. podjęli tego typu badania na ludzkich komórkach neuroblastomy SH-SY5Y stabilnie transfekowanych zmutowanym ludzkim genem *SOD1*^{G93A} [33]. Jako komórki kontrolne użyli komórek transfekowanych prawidłowym ludzkim genem *SOD1*. W badaniach obserwowano zwiększenie zawartości żelaza w lizatach komórkowych uzyskanych z komórek *SOD1*^{G93A} w porównaniu do lizatów z komórek kontrolnych. Stwierdzono również zwiększoną ekspresję genów *SLC11A2* i *TfR1* na poziomie mRNA, co sugeruje mechanizm zwiększonego poboru żelaza przez komórki *SOD1*^{G93A}. Mimo zwiększonej ekspresji mitoferrytyny 1 (białka występującego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, transportującego żelazo z cytoplazmy do mitochondriów [84]), nie stwierdzono różnic w zawartości żelaza w mitochondriach izolowanych z komórek *SOD1*^{G93A} i z komórek *SOD1*. Interesujące podejście metodyczne przyjęto w badaniach nad komórkowym metabolizmem żelaza prowadzonych na ludzkich komórkach glejaka/gwiaździka (glioblastoma/astrocytoma cells U373 MG (U373)) z nadekspresją zmutowanych ludzkich genów *SOD1*^{G93A} (mutacja niewpływająca na aktywność

enzymatyczną *SOD1*) i *SOD1*^{H46R} (substytucja histydyny w miejsce argininy w pozycji 46), jedną z mutacji leżących u podłoża ALS w rodzinnej postaci ALS, powodującej zahamowanie aktywności *SOD1*) oraz z nadekspresją „dzikiego” genu *SOD1* [18]. Stwierdzono, że ekspresja i aktywność *SOD1* są najwyższe w komórkach *SOD1*^{G93A} i *SOD1*, natomiast w komórkach *SOD1*^{H46R} ekspresja *SOD1* jest nawet niższa niż w komórkach nietransfekowanych. Wykorzystując ten kompleksowy układ doświadczalny stwierdzono zwiększoną ekspresję *TfR1* (na poziomie białka) w liniach komórkowych o podwyższonej aktywności *SOD1* (*SOD1*^{G93A} i *SOD1*), natomiast wzrost ferrytyny obserwowano tylko w komórkach transfekowanych genem „dzikim” (*SOD1*). Co niemniej istotne, stężenie ferrytyny w obu liniach komórkowych transfekowanych zmutowanymi genami *SOD1*^{G93A} i *SOD1*^{H46R} było porównywalne do stężenia tego białka w komórkach nietransfekowanych. Wyniki dobitnie dowodzą, że niektóre zmiany w metabolizmie żelaza obserwowane w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych i komórkowych ALS są jedynie skutkiem zwiększonej aktywności enzymatycznej *SOD1* i nie wiążą się z występowaniem mutacji w genie *SOD1*.

Niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów metabolizmu żelaza w ALS. Funkcjonowanie systemu IRP/IRE było przedmiotem badań na mysich i komórkowych modelach ALS. Badania proteomiczne prowadzone na asymptotycznych myszach z nadekspresją *SOD1*^{G93A} wykazały, że w rdzeniu kręgowym tych zwierząt poziom IRP1 jest 2-3-krotnie mniejszy od poziomu tego białka u myszy kontrolnych [67]. Nasze badania nie potwierdzają jednak tej obserwacji. Analiza poziomu białka IRP1 w rdzeniu kręgowym i w mózgu asymptotycznych i symptomatycznych myszy *SOD1*^{G93A} nie wykazała zmian w porównaniu do myszy z nadekspresją dzikiego genu *SOD1* oraz w porównaniu do myszy kontrolnych [24]. W rdzeniu kręgowym myszy z nadekspresją *SOD1*^{G37R} wykazano zwiększenie aktywności wiązania się IRP z IRE w porównaniu do aktywności stwierdzonej u myszy kontrolnych (posiadających jedynie swój własny gen *Sod1*) [45]. Jednak interpretacja wyniku ze względu na różne wzorce ekspresji genów w różnych typach komórek rdzenia kręgowego jest trudna. Ponadto w tych badaniach powraca problem doboru odpowiedniej grupy kontrolnej myszy. Jak wykazują wyniki badań *in vitro*, aktywację IRP1 (zwiększenie proporcji postaci apo-IRP1 do holo-IRP1) obserwowano zarówno w komórkach transfekowanych *SOD1*^{G93A}, jak i w komórkach transfekowanych „dzikim” genem *SOD1*. Oznacza to, że na aktywację IRP1 wpływa zwiększenie aktywności *SOD1*. Ekspresja mRNA regulowanych przez IRP1 w rdzeniu kręgowym (*DMT1*, ferroportyny i *TfR1*) nie była zawsze zgodna z kanonem potranskrypcyjnej regulacji przez apo-IRP1: owszem, w rdzeniu kręgowym obserwowano zwiększoną ekspresję *DMT1* (zgodnie ze stabilizacją transkryptu *DMT1* zawierającego sekwencje IRE w końcu 3'UTR przez apo-IRP1), ale już ekspresja *TfR1*, który powinien być regulowany podobnie jak *DMT1*, pozostawała bez zmian [45]. Natomiast ekspresja ferroportyny rosła, gdy tymczasem, apo-IRP1 powinno

hamować translację transkryptów zawierających IRE w końcu 5'UTR (w tym translację mRNA ferropor-
tyny) [45]. Oczywiście, system IRP/IRE nie jest jedynym
wpływającym na regulację genów metabolizmu żelaza.
Zmiany na poziomie mRNA obserwowane w badaniach
mysich [45,108] i komórkowych [33] modelach ALS sug-
erują silną regulację transkrypcyjną, której mechanizmy
nie są jednak znane. Jeżeli uwzględnimy brak informacji
na temat regulacji metabolizmu żelaza w ALS przez hep-
cydynę, to staje się oczywiste, że molekularne mecha-
nizmy zaburzenia homeostazy żelaza w ALS wymagają
jeszcze wielu badań.

Uważa się, że stres oksydacyjny odgrywa jedną z głów-
nych ról w degeneracji neuronów ruchowych występu-
jącej w ALS [5]. W przypadkach fALS uwarunkowanego
mutacjami w genie *SOD1* oraz w mysich modelach ALS
z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1*, źród-
łem nadmiaru reaktywnych pochodnych tlenu czę-

steczkowego może być nabycie nowej funkcji (gain of
function) przez *SOD1*, syntetyzowanej na bazie zmu-
towanego genu. Nowa aktywność *SOD1* może polegać
na zdolności generowania rodnika hydroksylowego,
a także na zdolności katalizowania reakcji peroksyda-
cji. Wiadomo, że w warunkach stresu oksydacyjnego
następuje zaburzenie wewnątrzkomórkowej home-
ostazy żelaza [62], czego skutkiem jest zwiększenie
tzw. labilnej puli żelaza, aktywnego w reakcji Fentona
[50]. Wydaje się więc, że deregulacja homeostazy żelaza
w neuronach ruchowych jest przede wszystkim czyn-
nikiem zwiększającym natężenie stresu oksydacyjnego,
czego dowodem są częściowo pozytywne skutki tera-
pii z zastosowaniem chelatorów żelaza u myszy, nosicieli
zmutowanego genu *SOD1*. Nie wydaje się prawdopo-
dobne, jak rozważają to niektórzy autorzy [33], aby
zmiany w ekspresji genów metabolizmu żelaza w ALS
wyprzedzały w czasie i indukowały występowanie
stresu oksydacyjnego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aisen P., Leibman A., Zweier J.: Stoichiometric and site charac-
teristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.*,
1978; 253: 1930-1937
- [2] Alexander J., Kowdley K.V.: HFE-associated hereditary hemochro-
matis. *Genet. Med.*, 2009;11: 307-313
- [3] Allen R.P., Earley C.J.: The role of iron in restless legs syndrome.
Mov. Disord. 2007; 22: S440-S448
- [4] Andrews N.C.: Forging a field: the golden age of iron biology.
Blood, 2008; 112: 219-230
- [5] Barber S.C., Mead R.J., Shaw P.J.: Oxidative stress in ALS: a mecha-
nism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim. Bio-
phys. Acta*, 2006; 1762: 1051-1067
- [6] Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN,
Warszawa 2003
- [7] Bartzokis G., Cummings J., Perlman S., Hance D.B., Mintz J.: In-
creased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch. Neu-
rol.*, 1999; 56: 569-574
- [8] Beard J.L.: Why iron deficiency is important in infant develop-
ment. *J. Nutr.*, 2008; 138: 2534-2536
- [9] Blasco H., Vourch P., Nadjar Y., Ribourtout B., Gordon P.H.,
Guettard Y.O., Camu W., Praline J., Meininger V., Andres C.R., Corcia
P.: Association between divalent metal transport 1 encoding gene
(SLC11A2) and disease duration in amyotrophic lateral sclerosis. *J.
Neurol. Sci.*, 2011; 303: 124-127
- [10] Brissot P., Ropert M., Le Lan C., Loréal O.: Non-transferrin bound
iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys.
Acta*, 2012; 1820: 403-410
- [11] Bush A.I.: The metal theory of Alzheimer's disease. *J. Alzheim-
ers Dis.*, 2013; 33: S277-S281
- [12] Cammer W.: Oligodendrocyte associated enzymes. W: Oligoden-
droglia. red., W.T. Norton, New York: Plenum, 1984, 199-232
- [13] Cermák J., Neuwirt J.: A half century since the isolation of crys-
talline ferritin by Professor Laufberger. *Vnitr. Lek.*, 1986; 32: 833-835
- [14] Charcot J.M., Joffroy A.: Deux cas d'atrophie musculaire progres-
sive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux
de la moelle epiniere. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.*, 1869; 2: 744-754
- [15] Clark S.F.: Iron deficiency anemia: diagnosis and management.
Curr. Opin. Gastroenterol. 2009; 25: 122-128
- [16] Cozzolino M., Ferri A., Valle C., Carri M.T.: Mitochondria and
ALS: implications from novel genes and pathways. *Mol. Cell. Neu-
rosci.*, 2013; 55: 44-49
- [17] Curtis A.R., Fey C., Morris C.M., Bindoff L.A., Ince P.G., Chinnery
P.F., Coulthard A., Jackson M.J., Jackson A.P., McHale D.P., Hay D.,
Barker W.A., Markham A.F., Bates D., Curtis A., Burn J.: Mutation in
the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-
onset basal ganglia disease. *Nat. Genet.*, 2001; 28: 350-354
- [18] Danzeisen R., Achsel T., Bederke U., Cozzolino M., Crosio C., Ferri
A., Frenzel M., Gralla E.B., Huber L., Ludolph A., Nencini M., Rotilio G.,
Valentine J.S., Carri M.T.: Superoxide dismutase 1 modulates expres-
sion of transferrin receptor. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006; 11: 489-498
- [19] Dobrowolny G., Aucello M., Rizzuto E., Beccafico S., Mammucari
C., Boncompagni S., Belia S., Wannenens F., Nicoletti C., Del Prete Z.,
Rosenthal N., Molinaro M., Protasi F., Fanò G., Sandri M., Musarò A.:
Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity.
Cell Metab., 2008; 8: 425-436
- [20] Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A., James S.A., Robb E., Wikke K.,
Leong S.L., Perez K., Johanssen T., Greenough M.A., Cho H.H., Galatis
D., Moir R.D., Masters C.L., McLean C. i wsp.: Iron-export ferroxidase
activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Al-
zheimer's disease. *Cell*, 2010; 142: 857-867
- [21] Ebrahimi K.H., Hagedoorn P.L., Hagen W.R.: A synthetic peptide
with the putative iron binding motif of amyloid precursor protein
(APP) does not catalytically oxidize iron. *PLoS One*, 2012; 7: e40287
- [22] Farquhar J., Zerkle A.L., Bekker A.: Geological constraints on the
origin of oxygenic photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 2011; 107: 11-36
- [23] Friedman A., Gałazka-Friedman J.: The history of the research
of iron in parkinsonian substantia nigra. *J. Neural. Transm.*, 2012;
119: 1507-1510
- [24] Gajowiak A., Styś A., Starzyński R.R., Bednarz A., Lenartowicz M.,
Staroń R., Lipiński P.: Mice overexpressing both non-mutated human

- SOD1 and mutated SOD1^{G93A} genes: a competent experimental model for studying iron metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.*, 2016; 8: 82
- [25] Galy B., Ferring D., Minana B., Bell O., Janser H.G., Muckenthaler M., Schümann K., Hentze M.W.: Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*, 2005; 106: 2580-2589
- [26] Gladman M., Zinman L.: The economic impact of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.*, 2015; 15: 439-450
- [27] Golub M.S., Germann S.L., Araiza R.S., Reader J.R., Griffey S.M., Lloyd K.C.: Movement disorders in the Hfe knockout mouse. *Nutr. Neurosci.*, 2005; 8: 239-244
- [28] Goodall E.F., Haque M.S., Morrison K.E.: Increased serum ferritin levels in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *J. Neurol.*, 2008; 255: 1652-1656
- [29] Grantham-McGregor S., Ani C.: A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J. Nutr.*, 2001; 131: 649S-666S
- [30] Grieb P.: Transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *Folia Neuropathol.*, 2004; 42: 239-248
- [31] Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y., Dal Canto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X. i wsp.: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 1994; 264: 1772-1775
- [32] Hadzhieva M., Kirches E., Mawrin C.: Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2014; 40: 240-57
- [33] Hadzhieva M., Kirches E., Wilisch-Neumann A., Pachow D., Wallesch M., Schoenfeld P., Paige I., Vielhaber S., Petri S., Keilhoff G., Mawrin C.: Dysregulation of iron protein expression in the G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, 2013; 230: 94-101
- [34] Hadziahmetovic M., Song Y., Ponnuru P., Iacovelli J., Hunter A., Haddad N., Beard J., Connor J.R., Vaulont S., Dunaief J.L.: Age-dependent retinal iron accumulation and degeneration in hepcidin knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011; 52: 109-118
- [35] Hallgren B., Sourander P.: The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J. Neurochem.*, 1958; 3: 41-51
- [36] Halon M., Kaczor J.J., Ziolkowski W., Flis D.J., Borkowska A., Popowska U., Nyka W., Wozniak M., Antosiewicz J.: Changes in skeletal muscle iron metabolism outpace amyotrophic lateral sclerosis onset in transgenic rats bearing the G93A hmsOD1 gene mutation. *Free Radic. Res.*, 2014; 48: 1363-1370
- [37] Halon M., Sielicka-Dudzin A., Wozniak M., Ziolkowski W., Nyka W., Herbik M., Grieb P., Figarski A., Antosiewicz J.: Up-regulation of ferritin ubiquitination in skeletal muscle of transgenic rats bearing the G93A hmsOD1 gene mutation. *Neuromuscul. Disord.*, 2010; 20: 29-33
- [38] Harrison P.M., Arosio P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1275: 161-203
- [39] Haverkamp L.J., Appel V., Appel S.H.: Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain*, 1995; 118: 707-719
- [40] Hebbrecht G., Maenhaut W., De Reuck J.: Brain trace elements and aging. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.*, 1999; 150: 208-213
- [41] Henderson B.R., Seiser C., Kühn L.C.: Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive elements. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 27327-27334
- [42] Ignjatović A., Stević Z., Lavrić S., Daković M., Bačić G.: Brain iron MRI: a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Magn. Reson. Imaging*, 2013; 38: 1472-1479
- [43] Ikeda K., Hirayama T., Takazawa T., Kawabe K., Iwasaki Y.: Relationships between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. *Intern. Med.*, 2012; 51: 1501-1508
- [44] Jeong S.Y., Crooks D.R., Wilson-Ollivierre H., Ghosh M.C., Sougrat R., Lee J., Cooperman S., Mitchell J.B., Beaumont C., Rouault T.A.: Iron insufficiency compromises motor neurons and their mitochondrial function in Irp2-null mice. *PLoS One*, 2011; 6: e25404
- [45] Jeong S.Y., Rathore K.I., Schulz K., Ponka P., Arosio P., David S.: Dysregulation of iron homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 610-619
- [46] Jiménez A.J., Domínguez-Pinos M.D., Guerra M.M., Fernández-Llebrez P., Pérez-Figares J.M.: Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, 2014; 2: e28426
- [47] Kasarskis E.J., Tandon L., Lovell M.A., Ehmann W.D.: Aluminum, calcium, and iron in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis using laser microprobe mass spectroscopy: a preliminary study. *J. Neurol. Sci.*, 1995; 130: 203-208
- [48] Keep R.F., Jones H.C.: A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1990; 56: 47-53
- [49] Krawiec P., Pac-Kozuchowska E.: The role of hepcidin in iron metabolism in inflammatory bowel diseases. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 936-943
- [50] Kruszewski M.: Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.*, 2003; 531: 81-92
- [51] Kupershmidt L., Weinreb O., Amit T., Mandel S., Carri M.T., Youdim M.B.: Neuroprotective and neurotogenic activities of novel multimodal iron-chelating drugs in motor-neuron-like NSC-34 cells and transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.*, 2009; 23: 3766-3779
- [52] Kwan J.Y., Jeong S.Y., Van Gelderen P., Deng H.X., Quezado M.M., Danielian L.E., Butman J.A., Chen L., Bayat E., Russell J., Siddique T., Duyn J.H., Rouault T.A., Floeter M.K.: Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: correlating 7 tesla MRI and pathology. *PLoS One*, 2012; 7: e35241
- [53] Lai C.H., Kuo K.H.: The critical component to establish in vitro BBB model: pericyte. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2005; 50: 258-265
- [54] Lambert J.F., Beris P.: Pathophysiology and different diagnosis of anemia. W: Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. Red.: C. Beaumont, P. Beris, Y. Beuzard. C. Brugnara. *Eur. School Haematology, Paris*. 2006; 73-101
- [55] LaVaute T., Smith S., Cooperman S., Iwai K., Land W., Meyron-Holtz E., Drake S.K., Miller G., Abu-Asab M., Tsokos M., Switzer R. III, Grinberg A., Love P., Tresser N., Rouault T.A.: Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 209-214
- [56] Leitner D.F., Connor J.R.: Functional roles of transferrin in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1820: 393-402
- [57] Levi S., Corsi B., Bosio M., Invernizzi R., Volz A., Sanford D., Arosio P., Drysdale J.: A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24437-24440
- [58] Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W.: Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 2013; 79: 416-38
- [59] Lipiński P., Starzyński R.R.: Regulation of body iron homeostasis by hepcidin. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 65-73
- [60] Lipiński P., Starzyński R.R.: The role of iron regulatory proteins

(IRPs) in the regulation of systemic iron homeostasis: lessons from studies on IRP1 and IRP2 knock out mice. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 322-330

[61] Lipiński P., Starzyński R.R., Styś A., Gajowiak A., Staroń R.: Heme metabolism as an integral part of iron homeostasis. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 557-570

[62] Lipiński P., Starzyński R.R., Styś A., Straciło M.: Iron homeostasis, a defense mechanism in oxidative stress. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 305-316

[63] Lipiński P., Styś A., Starzyński R.R.: Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early post-natal periods. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013; 70: 23-38

[64] Lozoff B., Georgieff M.K.: Iron deficiency and brain development. *Semin. Pediatr. Neurol.*, 2006; 13: 158-165

[65] Lozoff B., Jimenez E., Smith J.B.: Double burden of iron deficiency in infancy and low socioeconomic status: a longitudinal analysis of cognitive test scores to age 19 years. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 2006; 160: 1108-1113

[66] Maktabi M.A., Heistad D.D., Faraci F.M.: Effects of angiotensin II on blood flow to choroid plexus. *Am. J. Physiol.*, 1990; 258: H414-H418

[67] Massignan T., Casoni F., Basso M., Stefanazzi P., Biasini E., Tortarolo M., Salmons M., Gianazza E., Bendotti C., Bonetto V.: Proteomic analysis of spinal cord of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis G93A SOD1 mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 353: 719-725

[68] McCarthy R.C., Kosman D.J.: Ferroportin and exocytosomal ferroxidase activity are required for brain microvascular endothelial cell iron efflux. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 17932-17940

[69] McCarthy R.C., Kosman D.J.: Glial cell ceruloplasmin and hepcidin differentially regulate iron efflux from brain microvascular endothelial cells. *PLoS One*, 2014; 9: e89003

[70] McCarthy R.C., Kosman D.J.: Iron transport across the blood-brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015; 72: 709-727

[71] McCord J.M., Fridovich I.: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 1969; 244: 6049-6055

[72] McKie A.T.: The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 1239-1241

[73] Mitchell R.M., Simmons Z., Beard J.L., Stephens H.E., Connor J.R.: Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis. *Muscle Nerve*, 2010; 42: 95-103

[74] Moos T.: Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 1996; 375: 675-692

[75] Moos T., Skjørringe T., Gosk S., Morgan E.H.: Brain capillary endothelial cells mediate iron transport into the brain by segregating iron from transferrin without the involvement of divalent metal transporter 1. *J. Neurochem.*, 2006; 98: 1946-1958

[76] Musarò A.: Understanding ALS: new therapeutic approaches. *FEBS J.*, 2013; 280: 4315-4322

[77] Musci G., Polticelli F., Bonaccorsi di Patti M.C.: Ceruloplasmin-ferroportin system of iron traffic in vertebrates. *World J. Biol. Chem.*, 2014; 5: 204-215

[78] Nadjar Y., Gordon P., Corcia P., Bensimon G., Pieroni L., Meininger V., Salachas F.: Elevated serum ferritin is associated with reduced survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 2012; 7: e45034

[79] Nagańska E., Matyja E.: Amyotrophic lateral sclerosis – looking for pathogenesis and effective therapy. *Folia Neuropathol.*, 2011; 49: 1-13

[80] Nandar W., Neely E.B., Simmons Z., Connor J.R.: H63D HFE gen-

otype accelerates disease progression in animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1842: 2413-2426

[81] Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J.L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S.: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2002; 110: 1037-1044

[82] Oshiro S., Morioka M.S., Kikuchi M.: Dysregulation of iron metabolism in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2011; 2011: 378278

[83] Oski F.A., Honig A.S., Helu B., Howanitz P.: Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron-deficient infants. *Pediatrics*, 1983; 71: 877-880

[84] Paradkar P.N., Zumbrennen K.B., Paw B.H., Ward D.M., Kaplan J.: Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 1007-1016

[85] Patel B.N., Dunn R.J., David S.: Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4305-4310

[86] Petrak J., Vyoral D.: Hephaestin – a ferroxidase of cellular iron export. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2005; 37: 1173-1178

[87] Ramos P., Santos A., Pinto N.R., Mendes R., Magalhaes T., Almeida A.: Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014; 28: 13-17

[88] Renton A.E., Chiò A., Traynor B.J.: State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.*, 2014; 17: 17-23

[89] Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X.: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993; 362: 59-62

[90] Rouault T.A.: Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2013; 14: 551-564

[91] Rouault T.A., Cooperman S.: Brain iron metabolism. *Semin. Pediatr. Neurol.*, 2006; 13: 142-148

[92] Rouault T.A., Zhang D.L., Jeong S.Y.: Brain iron homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab. Brain Dis.*, 2009; 24: 673-684

[93] Schenck J.F.: Magnetic resonance imaging of brain iron. *J. Neurol. Sci.*, 2003; 207: 99-102

[94] Schulz K., Vulpe C.D., Harris L.Z., David S.: Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter. *J. Neurosci.*, 2011; 31: 13301-13311

[95] Skjørringe T., Møller L.B., Moos T.: Impairment of interrelated iron- and copper homeostatic mechanisms in brain contributes to the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Front. Pharmacol.*, 2012; 3: 169

[96] Speake T., Kibble J.D., Brown P.D.: Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the delayed-rectifying K⁺ conductance in rat choroid plexus epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004; 286: C611-C620

[97] Sreedharan J., Brown R.H. Jr.: Amyotrophic lateral sclerosis: problems and prospects. *Ann. Neurol.*, 2013; 74: 309-316

[98] Staroń R., Styś A., Starzyński R., Gajowiak A., Lipiński P.: Enterocyte – wąskie gardło metabolizmu żelaza. *Postępy Biol. Kom.*, 2015; 42: 329-350

[99] Styś A., Starzyński R.R., Lipiński P.: The role of iron regulatory proteins in the control of iron metabolism in mammals. *Biotechnologia*, 2011; 92: 66-75

[100] Takeda A., Devenyi A., Connor J.R.: Evidence for non-transferrin-mediated uptake and release of iron and manganese in glial

- cell cultures from hypotransferrinemic mice. *J. Neurosci. Res.*, 1998; 51: 454-462
- [101] Todorich B., Pasquini J.M., Garcia C.I., Paez P.M., Connor J.R.: Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*, 2009; 57: 467-748
- [102] Tomik B.: Diagnosis and treatment of amyotrophic lateral sclerosis according to EFNS recommendations (2005). *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2007; 41: 445-456
- [103] Turner B.J., Talbot K.: Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.*, 2008; 85: 94-134
- [104] Urrutia P., Aguirre P., Esparza A., Tapia V., Mena N.P., Arredondo M., González-Billault C., Núñez MT.: Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J. Neurochem.*, 2013; 126: 541-549
- [105] van Rheenen W., Diekstra F.P., van Doormaal P.T., Seelen M., Kenna K., McLaughlin R., Shatunov A., Czell D., van Es M.A., van Vught P.W., van Damme P., Smith B.N., Waibel S., Schelhaas H.J., van der Kooi A.J. i wsp.: H63D polymorphism in HFE is not associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging*, 2013; 34: 1517.e5-e7
- [106] Vaubel R.A., Isaya G.: Iron-sulfur cluster synthesis, iron homeostasis and oxidative stress in Friedreich ataxia. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2013; 55: 50-61
- [107] Veyrat-Durebex C., Corcia P., Mucha A., Benzmira S., Mallet C., Gendrot C., Moreau C., Devos D., Piver E., Pagès J.C., Maillot F., Andres C.R., Vourc'h P., Blasco H.: Iron metabolism disturbance in a French cohort of ALS patients. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 485723
- [108] Wang Q., Zhang X., Chen S., Zhang X., Zhang S., Youdium M., Le W.: Prevention of motor neuron degeneration by novel iron chelators in SOD1(G93A) transgenic mice of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.*, 2011; 8: 310-321
- [109] Wang W., Knovich M.A., Coffman L.G., Torti F.M., Torti S.V.: Serum ferritin: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1800: 760-769
- [110] Ward D.M., Kaplan J.: Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 1426-1433
- [111] Wong B.X., Tsatsanis A., Lim L.Q., Adlard P.A., Bush A.I., Duce J.A.: β -Amyloid precursor protein does not possess ferroxidase activity but does stabilize the cell surface ferrous iron exporter ferroportin. *PLoS One*, 2014; 9: e114174
- [112] Xu X., Pin S., Gathinji M., Fuchs R., Harris Z.L.: Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2004; 1012: 299-305
- [113] Yu J., Qi F., Wang N., Gao P., Dai S., Lu Y., Su Q., Du Y., Che F.: Increased iron level in motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients: an in vivo MR study. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, 2014; 15: 357-361
- [114] Zahs K.R., Bigornia V., Deschepper C.F.: Characterization of "plasma proteins" secreted by cultured rat macroglial cells. *Glia*, 1993; 7: 121-133
- [115] Zecca L., Stroppolo A., Gatti A., Tampellini D., Toscani M., Gallorini M., Giaveri G., Arosio P., Santambrogio P., Fariello R.G., Karatekin E., Kleinman M.H., Turro N., Hornykiewicz O., Zucca F.A.: The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 9843-9848
- [116] Zechel S., Huber-Wittmer K., von Bohlen und Halbach O.: Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 2006; 84: 790-800

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.