

## Vliv erythropoetinu na metabolismus železa

Srai SK, Chung B, Marks J, et al. Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure. *Kidney Int* 2010;78:660–667.

**Ž**elezo (Fe) je prvek, který hraje velmi důležitou roli v řadě metabolických pochodů v organismu člověka. Proto mají poruchy jeho homeostázy, které jsou velmi časté, zásadní vliv na morbiditu nemocných. Předpokládá se, že celosvětově trpí anémií z nedostatku železa asi jedna třetina populace. U řady z nich se pak na prohlubování anémie podílejí i další faktory, jako jsou chronická onemocnění či renální nedostatečnost. Na modelech hlodavců bylo ukázáno, že jejich tělo reaguje na dysbalanci v metabolismu železa různou úrovní absorpce Fe v enterocytech duodena. Anémie v organismu spouští hypoxii, která vede ke zvýšené produkci erythropoetinu (EPO). Tato reakce je ale výrazně utlumena v případě současně přítomné těžké renální nedostatečnosti. Tento problém lze vyřešit paralelním podáváním železa a EPO. Již delší dobu se předpokládá, že podávání EPO vede nejen k jeho substituci, ale že může ovlivňovat i homeostázu železa. Předpokládá se, že EPO může snižovat expresi hepcidinu, anebo může přímo stimulovat enterocyty ke zvýšené absorpci železa ve střevě. Heparin je hlavní regulátor tělesných zásob železa, který působí na řadu buněk (zejména na střevní makrofágy a enterocyty). V nich negativní zpětnou vazbou ovlivňuje uvolňování železa z jejich zásob do cirkulace (jde tedy o negativní regulaci; čím vyšší koncentrace hepcidinu, tím nižší uvolňování Fe do oběhu). Je známo, že u nemocných s CKD se koncentrace hepcidinu zvyšují, což může významnou měrou přispívat k nedostatečné utilizaci buněčných zásob železa. Cílem komentované práce bylo posoudit, zda exogenně podaný EPO snižuje hodnoty hepcidinu a zda současně také zvyšuje resorpci železa ze střeva.

Model CKD byl navozen u potkanů kmene Sprague-Dawley 5/6 nefrektomií (skupina N); kontrolní skupina podstoupila operaci bez nefrektomie (sham operation, skupina S). Čtyři týdny před experimentem byla zvířata krmena stravou s nízkým obsahem železa. Následně byla rozdělena do tří skupin: jedné skupině byl dvakrát týdně i.p. aplikován humánní EPO (E) v dávce 100 U/kg, celkem po dobu pěti týdnů; druhé byl aplikován terpentýn (T) s.c. (0,1 ml/20 g váhy) a třetí skupině obojí (E + T). Absorpce železa byla měřena pomocí radioizotopu  $^{59}\text{Fe}$ , který byl v definovaném množství instilován přímo do duodena zvířat a vzorky krve byly odebírány z femorální žíly. Vliv EPO na absorpci železa byl zkoumán také na buněčné kultuře lidských enterocytů (Caco-2 cells). I zde byly buňky po inkubaci s EPO vystaveny následnému působení roztoku s obsahem  $^{59}\text{FeCl}$  a poté měřena aktivita izotopu. Koncentrace hepcidinu byla nepřímě měřena stanovením jeho mRNA v jaterní tkáni, mukóze duodena a Caco-2 buněčné kultuře.

Skupina potkanů s nefrektomií (N) měla signifikantně vyšší sérové koncentrace kreatininu a urey ( $p < 0,05$ , resp.  $p < 0,01$ ) oproti skupině S a zároveň signifikantně nižší hodnoty hematokritu (Hct) a hemoglobinu (Hb). Koncentrace železa v séru se mezi skupinou S a N nelišily a k jejich ovlivnění nedošlo ani po přidání EPO. Přidání EPO zvýšilo významně hematokrit u obou skupin (S i N). U obou skupin se hodnoty hematokritu zvýšily i po přidání terpentýnu a ještě výrazněji po následné aplikaci EPO.

Dle očekávání se ukázalo, že potkani ze skupiny N měli významně vyšší hodnoty hepcidinu než potkani ve skupině S ( $p < 0,002$ ). Ačkoli aplikace EPO vedla k výraznému snížení hepcidinu u skupiny N na úroveň skupiny S, nebylo toto snížení statisticky významné. Po podávání EPO potkanům ve skupině S k dalšímu

snížení hepcidinu nedošlo. Přidání terpentýnu významně zvýšilo koncentrace hepcidinu u obou skupin a následná léčba EPO snížila hodnoty hepcidinu jen u skupiny N, nikoli u skupiny S.

Pokud šlo o transport železa přes epitel duodena a jeho objevení se v plazmě, ukázalo se, že u potkanů skupiny N byl tento transport v porovnání se skupinou S významně snížen ( $p < 0,03$ ). Po přidání EPO se absorpce železa ze střeva výrazně zvýšila ve skupině N (na úroveň skupiny S), zatímco ve skupině S zůstala stejná. Naopak výrazné snížení absorpce železa u obou skupin se vyskytlo po přidání terpentýnu (jako faktoru zvyšujícího zánět). Zajímavé je, že přidání EPO skupině N léčené terpentýnem vedlo ke snížení hepcidinu a zvýšení hematokritu (viz výše), ale neovlivnilo nikterak absorpci železa, která zůstala nízká. Pokud jde o koncentrace mRNA ferroportinu a DMT1 (apical divalent metal transporter 1), byly významně sníženy u skupiny N, která byla současně předléčena terpentýnem.

K ozřejmení přímého účinku EPO na transport železa ve střevě byla použita Caco-2 buněčná kultura, která byla vystavena po dobu 24 hodin účinku nízké dávky EPO (1 U/ml). K objasnění exprese genů pro jednotlivé transportní proteiny byly měřeny mRNA DMT1 a duodenálního cytochromu b (Dcytb), které zajišťují transport železa na apikální membráně enterocytů, a ferroportinu a hephaestinu, které zajišťují jeho transport na bazolaterální straně enterocytů. Ukázalo se, že EPO významně zvyšuje mRNA u DMT1, ferroportinu a hephaestinu, zatímco exprese mRNA Dcytb není ovlivněna. V souladu s tímto nálezem se potvrdilo, že zvýšení exprese genů pro transportní proteiny pro železo je po přidání EPO spojeno s urychlením a zvýšením transportu  $^{59}\text{Fe}$  přes tuto vrstvu buněk, a to ve směru z apikálního na bazolaterální konec (tento transport je 500–1 000krát silnější než ve směru opačném). Účinek EPO zřejmě probíhá prostřednictvím jeho vazby na JAK2 tyrosinkinázu v enterocytech.

Závěrem autoři uzavírají, že EPO ovlivňuje využití železa nejen snížením aktivity a exprese mRNA pro hepcidin (což umožňuje uvolňování Fe z makrofágů a enterocytů), ale vede i ke zvýšení aktivity dalších transportérů pro železo lokalizovaných přímo v enterocytech (DMT1, ferroportin a hephaestin) prostřednictvím své vazby na JAK2.

## ■ KOMENTÁŘ

**Doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.**

Monitorace zásob železa v organismu jedinců s těžšími formami CKD je problematická, jelikož sérová koncentrace železa nevypovídá o jeho aktuálních zásobách a už vůbec ne o jeho využitelnosti pro erytropoézu. O zásobách železa přesněji vypovídají koncentrace ferritinu, ale jako protein akutní fáze je ferritin významnou měrou ovlivněn často přítomným zánětem, který jeho hodnoty arteficiálně zvyšuje.

Jak bylo zmíněno již výše a jak ukazuje řada publikovaných sdělení, je klíčovým proteinem ovlivňujícím využití železa v organismu hepcidin. Hepcidin, který je u nemocných s CKD významně zvýšen, působí jako hlavní regulátor metabolismu železa. Omezuje uvolňování železa ze zásobních zdrojů (enterocyty, makrofágy retikuloendoteliálního systému). Aplikace EPO snižuje expresi genu pro hepcidin a tím jeho supresi, výsledkem čehož je zlepšení využití železa. Zajímavé ale je, že pokud v těle neprobíhá účinná erytropoéza, vliv aplikace EPO na supresi hepcidinu chybí. To tedy automaticky předpokládá existenci dalších faktorů, které tento proces ovlivňují (Vokurka, 2006; Pak, 2006). Komentovaná práce všechny tyto předpoklady potvrzuje. Podání EPO jak potkanům s 5/6 nefrektomií, tak kontrolní operované skupině vedlo k výraznému vzestupu hodnot hemoglobinu a hematokritu, aniž to bylo doprovázeno vzestupem sérové koncentrace železa. Doku-

mentované snížení koncentrace hepcidinu totiž vedlo ke zlepšení transportu železa v duodenálních enterocytech, a tím se zvýšila jeho biologická dostupnost. Hlavní důvod zvýšené koncentrace hepcidinu u nemocných s CKD je spojen se zvýšeným prozánětlivým stavem těchto nemocných, spíše než s poruchou jeho vylučování. Hepcidin se proto řadí mezi proteiny akutní fáze a na zvýšení jeho exprese se může podílet řada prozánětlivých cytokinů, např. TNF $\alpha$  či IL-6 (Nicolas, 2002; Nemeth, 2003). V komentované studii byl prozánětlivý stav navozen podkožní aplikací terpentýnu, která jak známo navozuje v organismu zánětlivé prostředí. Po jeho aplikaci se významným způsobem zvýšila exprese hepcidinu a snížil transport železa v duodenálních enterocytech. Překvapivé ale bylo, že aplikace EPO sice významně snížila koncentraci hepcidinu, ale u skupiny nefrektomovaných potkanů s aplikací terpentýnu to nevedlo ke zlepšení transportu železa v duodenálních enterocytech. To by tedy podporovalo hypotézu (již výše uvedenou), že se zde uplatňují ještě další vlivy a faktory mimo hepcidin, a to zejména přímé působení prozánětlivých cytokinů na ferroportin a další transportní proteiny.

Diskuse týkající se přímého působení EPO na resorpci železa ve střevě vycházely z hypotézy, že přímo na povrchu enterocytů se nacházejí receptory pro EPO. Jejich existence se předpokládá na obou stranách buňky, tedy jak bazolaterální, tak apikální. V komentované práci se působení EPO prokázalo pouze u receptoru lokalizovaného na bazolaterální straně buňky. EPO receptor je funkčně spjat s aktivací JAK2 (tyrosine-kinase Janus kinase 2), která vede k aktivaci celé řady buněčných pochodů. V této práci se přímý efekt EPO na transepiteliální transport železa přes receptor JAK2 prokázal nepřímě, a to přidáním inhibitoru JAK2 k buněčným kulturám, což významnou měrou snížilo expresi transportních proteinů ferroportinu a DMT1.

Závěrem lze tedy konstatovat, že proces využití železa a jeho vstřebávání ve střevě u nemocných s CKD (a potažmo chronickým zánětlivým stavem) je velmi komplexní a složitý a že je ovlivněn celou řadou transportních proteinů, jejichž existence se odhalila teprve v nedávné době. To do značné míry vysvětluje i skutečnost, že železo se po perorálním podávání u těchto nemocných velmi omezeně vstřebává a k dosažení uspokojivých zásob je nutná jeho parenterální aplikace. Jeho využití pak zlepšuje časné podávání EPO a snížení zánětu v organismu.

## Literatura

- Nemeth E, Valore EV, Territo M, et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute phase protein. *Blood* 2003;101:2461–2463.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–1044.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, et al. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–3735.
- Vokurka M, Krijt J, Sulc K, et al. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;55:667–674.