

РЕАКЦИЯ ФЕНТОНА *IN VIVO* И *IN VITRO*. ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

©2024 г.

К. О. МУРАНОВ

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Метаболизм железа в организме. III. Механизмы транспорта железа. IV. Реакция фентона *in vitro*. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В 2024 году исполняется 130 лет со времени опубликования исследования Henry John Horstman Fenton под названием «Окисление винной кислоты в присутствии железа» [1]. Не могу не процитировать одну из фраз из этого сочинения, от которой веет флёром романтики науки прошлых времен: «...the filtered liquid has very powerful reducing properties, and, with ferric chloride and alkali, gives a violet colour, which is changed to a transient emerald-green by dilute mineral acids.». Примерно до 50-х годов 20 века реакция Фентона была предметом исследования, в основном, химической науки. Исключение составила монография H.D. Dakin «Oxidations and reductions in the animal body», вышедшая в 1922 году [2]. К сожалению, монография для меня оказалась недоступна и остаётся лишь гадать о её содержании. Интересно, что ещё в 1948 году реакция Фентона нашла практическое применение. Была разработана технология хранения замороженных стейков и филе лосося с использованием аскорбиновой кислоты, которая защищала жир от окисления [3].

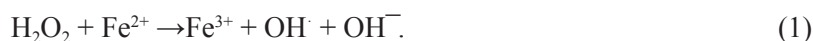
Принятые сокращения: DСУТВ – дуоденальная ферредуктаза цитохрома В; DMT1 – переносчик ионов двухвалентного металла-1; FPN1 – ферропортин; HEME – гем; HMOX1 – гемоксигеназа 1; HP – гестин; HR – рецептор гема; HRG1 – трансмембранная гем-чувствительная пермеаза гем-1; NHE3 – натрий-протоновый обменник-3; NTBI – гетерогенная смесь низкомолекулярных форм железа; PCBP – поли(гС)-связывающий белок (металлошаперон); TF – трансферрин; TFR1 – рецептор трансферрина

Адрес для корреспонденции: k.muranov@sky.chph.ras.ru

Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, в рамках темы № 0084-2014-0014, № гос. регистрации 01201253314

В середине 50-е годы появилась публикации, в которых реакция Фентона были использована для изучения повреждения ДНК, при этом в некоторых случаях был зафиксирован эффект повреждения, а в некоторых нет [4]. Вероятно, это исследование можно считать границей, после которой началось исследование возможного участия реакции Фентона в биологических процессах. На рисунке 1 показана динамика роста количества публикаций, полученная на основе поиска в PubMed по фразе «Реакция Фентона». Быстрый рост количества исследований наблюдается примерно с середины 80х годов 20 века.

Конечно, в современном виде уравнение реакции (Реакция 1) было предложено не сразу.



Вот, например, четыре реакции (сохранён формат записи), взятые из исследования Хабера и Вайса, опубликованного в 1934 году [5].



Реакция 2 является точной копией реакции 1. Вероятно, простота записи этих реакций и возможность объяснить таким образом свободнорадикальное повреждение биологических субстратов привлекло внимание многих исследователей. Однако Хабер и Вайс в следующей же строке после реакции 5 отмечали: «By a neutral solution we mean one in which all the ferrous ion remain in solution while all ferric compound have been precipitated.». Тем не менее, факт того, что биологические среды, в основном, имеют нейтральный или слабощелочной pH, а при таких значениях pH свободный ион железа моментально превращается в соответствующий гидроксид, во внимание не принимался. Анализ литературы показывает, что в редких работах исследователи обращают внимание на то, что в биологических системах, исключая лизосомы или химус желудка и верхнего отдела двенадцатиперстной кишки, где, как известно, среда имеет кислый pH, существование иона железа как самостоятельной частицы затруднительно.

Основной целью настоящего обзора литературы является попытка, рассмотрев, в общем, метаболизм железа в организме, указать возможные места появления ионов железа, как свободных частиц. А также рассмотреть возможность участия железа в виде свободного иона или в виде нерастворимого в воде гидроксида в инициации процессов свободнорадикального окисления.

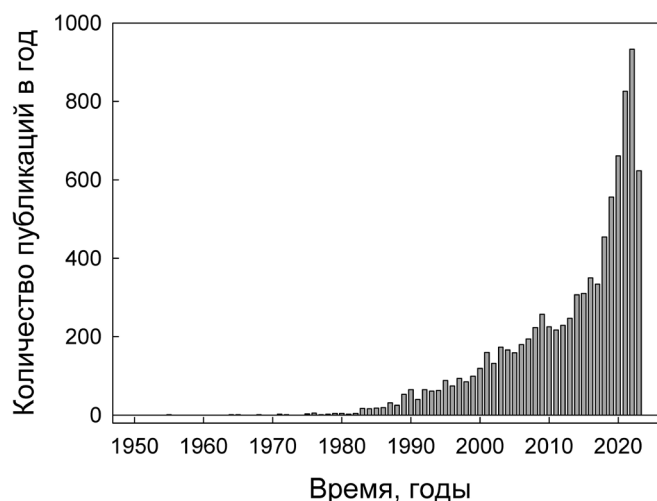


Рис. 1. Рост количества публикаций на тему исследования реакции Фентона.

II. МЕТАБОЛИЗМ ЖЕЛЕЗА В ОРГАНИЗМЕ

На рисунке 2 представлена схема метаболизма железа в организме млекопитающих. Основная часть пула железа – это рециркулирующее железо, в основном, состоящее из железа гемоглобина стареющих или повреждённых эритроцитов. С помощью каскада специализированных клеток, включающего макрофаги, клетки печени и костного мозга это железо используется в производстве новых эритроцитов [6]. Часть железа в процессе рециркуляции выводится из организма, и эта недостача компенсируется за счет пищи. По оценкам, приведенным в обзоре М. Кнутсона [7], в процессе рециркуляции железа у человека участвует примерно 25 мг железа в день, тогда как с пищей поступает в день 1–2 мг.

Энтероциты проксимального отдела двенадцатиперстной кишки поглощают железо и выводят его в кровоток, где оно связывается транспортным белком трансферрином. Большая часть циркулирующего в крови трансферрина, нагруженного железом, поглощается в костном мозге, где железо используется в синтезе гемоглобина. Железо из стареющих или повреждённых эритроцитов, которые утилизируются макрофагами селезёнки, печени и костного мозга, вновь поступает в кровоток в комплексе с трансферрином.

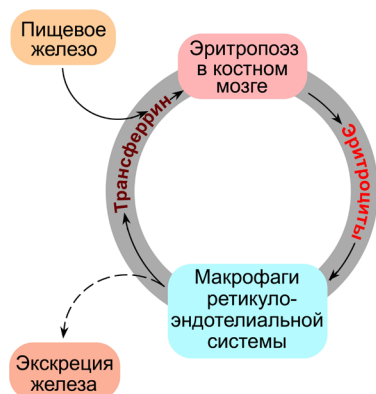


Рис. 2. Схема круговорота железа в организме млекопитающих.

Поступает в организм железо в двух формах: гемового или негемового железа. Гем (железо-протопорфирин IX) содержится в мясе, птице и морепродуктах и образуется, главным образом, из гемоглобина и миоглобина. Негемовое железо – это различные формы неорганического железа в находящиеся в растениях. Продукты животного происхождения также содержат негемовое железо в составе ферритина.

III. МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА ЖЕЛЕЗА

ТРАНСПОРТ ЖЕЛЕЗА В СОСТАВЕ ГЕМА

В 1970-х и 1980-х годах эксперименты на кишечнике свиньи с использованием радиоактивной метки показали, что гем связывается на специальном рецепторе ($K_d = 10^{-6} - 10^{-7}$ М) плазматической мембраны энтероцитов верхнего отдела двенадцатиперстной кишки (Рис. 3) [8]. Затем с помощью эндоцитоза гем транспортируется внутрь клетки [9]. В транспорте гема участвует трансмембранная гем-чувствительная пермеаза гем-1 (HRG1) [10]. HRG1 в энтероцитах действует на апикальной мембране и мембранах внутриклеточных везикул [11]. Внутри энтероцита гем расщепляется гемоксигеназой 1 (НМОХ1), и освобождённое железо в виде Fe^{2+} включается в пул поглощённого клеткой неорганического железа [12].

ТРАНСПОРТ НЕГЕМООВОГО ЖЕЛЕЗА

Транспорт железа энтероцитами

Пищевое негемовое железо в форме Fe^{2+} в присутствии кислорода быстро окисляется до Fe^{3+} , растворимого в кислой среде желудка. В кислой среде проксимального отдела двенадцатиперстной кишки железо транспортируется через апикальную мембрану энтероцитов с помощью белка-переносчика ионов двухвалентных металлов (DMT1 – divalent metal-ion transporter 1) из семейства транспортеров растворённых веществ (SLC11A2, solute carrier family 11 member 2) [13, 14].

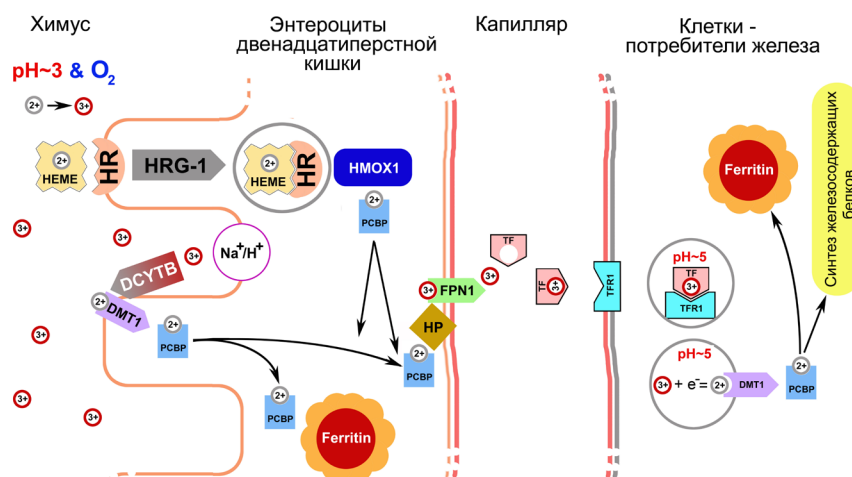


Рис. 3. Основные пути метаболизма железа в организме

Fe^{2+} – серый круг с надписью 2+, Fe^{3+} – красный круг с надписью 3+, HEME – гем, HR – рецептор гема, HRG1 – трансмембранная гем-чувствительная пермеаза гем-1, HMOX1 – гемоксигеназа 1, DMT1 – переносчик ионов двухвалентного металла-1, NHE3 – натрий-протоновый обменник-3, DCYTB – дуоденальная ферредуктаза цитохрома В, PCBP – поли(гС)-связывающий белок (металлошаперон), HP – гепестин, FPN1 — ферропортин; Ferritin – ферритин, TF – трансферрин, TFR1 – рецептор трансферрина.

У мышей с делецией *Slc11a2* наблюдается снижение концентрации железа в энтероцитах, развивается тяжёлая железодефицитная анемия [15, 16]. По всей видимости DMT1 это единственный переносчик пищевого железа в энтероцитах [17]. Химус в верхней части двенадцатиперстной кишки также имеет кислую среду, которая является необходимым условием функционирования DMT1 [13]. Закисление среды обеспечивается не только желудочным соком, но и работой Na^+/H^+ обменника (NHE3), который, закачивая Na^+ внутрь клетки, наружу выводит H^+ [18]. Однако DMT1 переносит железо только в восстановленной форме Fe^{2+} [19]. Поэтому, при поглощении железа энтероцитом, Fe^{3+} восстанавливается до Fe^{2+} под действием ферредуктазы дуоденального цитохрома В (DCYTB), которая также, как и DMT1 находится на апикальной мембране энтероцитов [17].

Из энтероцита в кровь железо транспортируется с помощью белка ферропортина (FPN1), из семейства транспортёров растворённых веществ (SLC40A1), который расположен на базолатеральной мембране [20–22]. Ферропортин, также как и DMT1, способен переносить только Fe^{2+} [23], тогда как трансферрину для образования

комплекса с железом требуется Fe^{3+} . Поэтому с помощью заякоренной в базолатеральной мембране феррооксидазы гефестин (HP) Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} [24]. У мышей с нокаутом гефестина наблюдается накопление железа в энтероцитах и легкая железодефицитная анемия [24].

Как железо, которое поглощается на апикальной мембране, пересекает цитозоль и достигает базолатерального ферропортина (FNP1), неизвестно, но в транспорте вероятно участвует поли(гС)-связывающий белок (PCBP), называемый металлошапероном [22]. Также PCBP доставляет цитозольное железо для хранения и дальнейшего использования к ферритину [25-26].

Ферритин представляет собой олигомерный белок, состоящий из 24 тяжёлых (H) и лёгких (L) субъединиц. Соотношение между H- и L-субъединицами варьирует в зависимости от ткани. Тяжёлая субъединица обладает феррооксидазной активностью, которая превращает Fe^{2+} в Fe^{3+} , тогда как лёгкая субъединица отвечает за минерализацию железа, которое хранится в виде гидроксида в ядре ферритина [27–28]. В ферритиновом ядре насчитывают около 4500 атомов железа в виде гётита, магнетита, акадонита и гематита [29–30]. У мышей со специфичной для кишечника делецией ферритина H наблюдается снижение концентрации железа в энтероцитах и повышение запаса железа в других тканях организма, что указывает на то, что ферритин H в энтероцитах участвует в регулировке транспорта железа [31]. Железо, находящееся в ферритине энтероцитов, изолируется от цитоплазмы и используется по мере необходимости. Однако это железо будет потеряно в результате десквамации энтероцитов, которые и у людей, и у мышей обновляются примерно каждые 3 дня [32].

Следующий путь высвобождения железа – это деградация ферритина в лизосомах [33]. Для доставки ферритина в лизосомы в клетке используется специальный высокоаффинный переносчик NCOA4 (selective cargo-receptor Nuclear Receptor Coactivator-4). В клетках с дефицитом NCOA4 снижена способность расщеплять ферритин, что приводит к снижению биодоступности внутриклеточного железа. NCOA4 связывает ферритин и направляет его на возникающие аутофагосомы [34–35]. Таким образом ион Fe^{2+} оказывается в цитоплазме, где он опять связывается поли(гС)-связывающим белком (PCBP2) [22]. PCBP2 связывает Fe^{2+} с $K_d = 0,9 \cdot 10^{-6}$ М для первого сайта связывания и $K_d = 5,8 \cdot 10^{-6}$ М в среднем для второго и третьего сайтов связывания [36].

Исследования на эпителиальных клетках человека, показали, что PCBP2 (но не PCBP1) физически взаимодействует с DMT1 и ферропортином [37–38]. Также была обнаружена колокализация ферро-

портина и гефестина вблизи базолатеральной мембраны энтероцитов двенадцатиперстной кишки [39–40]. Иными словами, железо в виде иона Fe^{2+} , связанном на PCBR, доставляется к базолатеральной мембране энтероцита, где окисляется гефестином и с помощью ферропортина (FPN1) выводится в кровяное русло.

В крови ион Fe^{3+} моментально связывается транспортным белком трансферрином в апо-форме. Следует отметить необычайно высокое сродство иона Fe^{3+} и апотрансферрина, константа диссоциации имеет порядок 10^{-27} М [41]. Для сравнения константа диссоциации для Fe^{2+} равна $25.2 \cdot 10^{-9}$ [42]. Связывание железа трансферрином координируется карбонатом, без которого белок теряет свое высокое сродство к железу [43]. Каждая молекула апотрансферрина может связывать 2 иона Fe^{3+} [44].

Транспорт железа из кровотока в цитоплазму клетки, нуждающейся в железе, проходит в три стадии: 1) связывание голотрансферрина, т. е. трансферрина, нагруженного железом, на специализированном рецепторе 1, что стимулирует эндоцитоз [45]; 2) высвобождение и восстановление железа в кислой среде эндосомы (pH ~ 5) [46–47]; 3) перенос Fe^{2+} через мембрану эндосомы белками-переносчиками двухвалентного железа [13–15]. Далее Fe^{2+} используется для синтеза железосодержащих белков или с помощью PCBP2 направляется в ферритин.

Регуляция концентрации железа в крови осуществляется на стадии транспорта через базальную мембрану с помощью ферропортина. Пептидный гормон гепсидин, секретируемый в основном гепатоцитами, инактивирует ферропортин и запускает эндоцитоз [48], что приводит к снижению концентрации Fe^{3+} в крови.

Транспорт железа в макрофагах

Стареющие или повреждённые эритроциты выводятся из кровотока макрофагами печени, селезёнки и костного мозга, которые в совокупности называются ретикулоэндотелиальной системой [6]. Макрофаги распознают такие эритроциты, поглощают их и помещают в фагосомы, которые сливаясь с лизосомами превращаются в фаголизосомы. Гидролитические ферменты внутри фаголизосом «переваривают» эритроциты и их гемоглобин. Высвобожденный гем перемещается через мембрану фаголизосом в цитозоль через HRG1 – специфический белок макрофагов [10]. Гем, оказавшийся в цитозоле, индуцирует экспрессию гемооксигеназы 1 (HMOX1). Этот фермент из семейства белков теплового шока, находящийся в мембранах эндоплазматического ретикулума, расщепляет гем на железо, СО и

биливердин [49]. Учитывая, что свободный гем обладает высокой цитотоксичностью, вероятно существуют специальные механизмы для защиты макрофага при эритрофагоцитозе [50].

Макрофаги могут дополнительно поглощать гемоглобин и гем из кровотока. Гемоглобин появляется в плазме крови в результате внутрисосудистого гемолиза, как физиологического, так и патологического. На долю физиологического гемолиза приходится не менее 10% распада эритроцитов у здоровых людей [51]. Свободный гемоглобин в плазме крови связывается с белком гаптоглобином, с образованием гемоглобин-гаптоглобинового комплекса. Этот комплекс связывается рецептором-мусорщиком CD163, который присутствует исключительно на плазмолемме макрофагов [52–53]. Гемоглобин, не связанный с гаптоглобином, также может поглощаться CD163 (кластер дифференциации 163) [54]. Обширный гемолиз может истощать запасы гаптоглобина, что приводит к появлению в плазме свободного гемоглобина. Когда это происходит, то железо гемоглобина в форме Fe^{2+} окисляется до трёхвалентного (Fe^{3+}). Это приводит к высвобождению гема, который в свою очередь связывается с гликопротеином плазмы гемопексином. Гемопексин связывает гем в неактивной форме и транспортирует его в печень, где он поглощается клетками Купфера с помощью эндоцитоза через LRP белок (белок, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности, также известный как CD91) [55]. В эндосоме гем отделяется от гемопексина и транспортируется в цитозоль, где катаболизируется НМОХ1. Интересно, что исследования мышей с нокаутом гена гемопексина показали, что клетки Купфера могут поглощать гем независимо от гемопексина [56].

Транспорт железа в гепатоцитах

Гепатоциты поглощают железо в различных формах: железо, связанное с трансферрином (ТБИ), железо, не связанное с трансферрином (НТБИ), а также в виде гемоглобина и гема. ТБИ связывается специальным рецептором (TFR1), расположенным на мембране синусоидальных клеток и с помощью эндоцитоза попадает внутрь клетки [57]. В кислой среде эндосомы Fe^{3+} высвобождается из трансферрина и восстанавливается до Fe^{2+} . Затем через DMT1 железо попадает в цитозоль [58].

НТБИ – гетерогенная смесь низкомолекулярных форм железа также поглощается печенью через трансмембранный переносчик ионов металлов – ZRT/IRT-подобный белок-14 (ZIP14/SLC39A14), расположенный на синусоидальной мембране гепатоцитов [59]. Точная

химическая природа НТВ1 неизвестна, но в основном НТВ1 являются соединениями железа, например в виде цитрата [60]. Учитывая, что ZIP14 транспортирует Fe^{2+} , но не Fe^{3+} , необходимо восстановление Fe^{3+} , что происходит, вероятно, с участием специальной редуктазы [61]. Возможно, что редуктазная активность обеспечивается прионным белком (PrPc) [62].

«ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ» В СХЕМЕ ТРАНСПОРТА ЖЕЛЕЗА В ОРГАНИЗМЕ

Подводя итог рассмотрения путей метаболизма в организме, можно сказать, что транспорт железа происходит в связанном с белками состоянии, что защищает организм от токсического действия железа. Однако можно указать несколько «горячих» точек, где происходит стыковка транспортных путей. Можно предположить, что именно в этих точках могут происходить «утечки» ионов железа. Рассмотрим эти точки подробнее.

DMT1, белок-транспортёр двухвалентных катионов

DMT1, то есть белок-транспортёр двухвалентных катионов способен переносить внутрь клетки не только Fe^{2+} , но и ионы Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , VO^{2+} и Zn^{2+} [63]. Транспорт Fe^{2+} активируется в кислой среде (19). Кинетический анализ транспорта Fe^{2+} в ооцитах показал, что низкий внеклеточный pH, во-первых, увеличивает кажущееся сродство DMT1 к Fe^{2+} и, во-вторых, обеспечивает термодинамическую движущую силу для транспорта Fe^{2+} . При этом поток Fe^{2+} внутрь клетки сопряжён с потоком H^+ наружу. Компьютерное моделирование механизма транспорта показало, что антипорт включает в себя два процесса: (1) переориентацию заряженного DMT1 внутри электрического поля мембраны и (2) связывание/диссоциация движущего иона в пределах электрического поля мембраны [64]. В дальнейшем в дело вступает Поли(rC)-связывающий белок (PCBP).

PCBP, поли(rC)-связывающий белок

Поли(rC)-связывающие белки (PCBP) первоначально были идентифицированы как молекулы, связывающие РНК/ДНК. Однако недавно было показано, что PCBP1, и PCBP2 обладают способностью связывать и транспортировать железо внутри клетки [65]. PCBP1 и PCBP2 экспрессируются в различных тканях организма и выполняют функцию железо-шаперона, получая Fe^{2+} от белков-доноров отдавая его белкам-акцепторам [66].

Апо форма PCBP2, то есть белок, не содержащий железо, связывается с экспонированной в цитозоль N-концевой областью DMT1,

нагруженного железом. Связывая железо, полученное от DMT1, РСВР2 переходит в форму голо форму белка. Как апо-РСВР2, так и голо-РСВР2 не способны связываться с апо-DMT1 [37]. РСВР2, нагруженный железом (голо форма), связывается с экспонированным в цитозоль С-концом обеднённого железом ферропортина FPN1 и передаёт ему Fe^{2+} [38, 67]. Однако, ферропортин переносит через мембрану Fe^{3+} . Поэтому в процессе еще участвует феррооксидаза гефестин окисляющая Fe^{2+} до Fe^{3+} (см. далее).

Также было обнаружено, что в макрофагах и гепатоцитах РСВР2 участвует в транспорте железа, возникшего в результате деградации гема [68]. Гемоксигеназа (НМОХ1) в комплексе с НАДФН-цитохром-редуктазой P450, которые находятся на мембранах эндоплазматического ретикулума, «переваривают» гем, высвобождая Fe^{2+} . РСВР2 в апо форме связывает этот ион, и образовавшаяся голо форма белка отделяется от комплекса НМОХ1/НАДФН-цитохром-редуктазы P450. Далее РСВР2 передаёт железо белкам-акцепторам (FPN1 или другие апоферменты) [69].

Как DMT1, так и FPN1 транспортируют двухвалентное, но не трёхвалентное железо, хотя в течение в течение многих лет предполагалось, что внутриклеточное железо существует в равновесии между этими двумя окислительно-восстановительными состояниями, связанными с низкомолекулярными эндогенными хелаторами, такими как аминокислоты, цитрат, АТФ и т. д. [70].

Ферропортин

У млекопитающих ферропортин (FPN) является единственным известным экспортёром железа. Этот интегральный мембранный белок локализован на базолатеральной мембране энтероцитов, макрофагов и гепатоцитов. Переносчик РСВР2, нагруженный железом, связывается с С-концом ферропортина, экспонированным в цитоплазму. РСВР1, РСВР3 и РСВР4 такой способностью не обладают [38, 71]. Ферропортин экспортирует железо из клетки в виде иона Fe^{3+} , поэтому связанный с РСВР2 ион Fe^{2+} вначале окисляется с помощью гефестина – трансмембранной медьсодержащей феррооксидазы [72]. В макрофагах и гепатоцитах в этом процессе также участвует и церулоплазмин [73, 74]. С помощью нативного электрофореза было показано, что ферропортин и гефестин образуют комплекс в котором происходит окисление железа [75]. Взаимодействие между ферропортином и гефестином может регулировать процесс транспорта железа в энтероцитах [40, 76].

Отметим, что регуляция транспорта железа осуществляется также и на уровне ферропортина, который является рецептором для гормона гепсидина. Связывание гепсидина активирует интернализацию ферропортина. Ферропортин в дальнейшем «разбирается» в системе юбиквитинового протеолиза. Этот процесс снижает транспорт железа из дуоденальных энтероцитов, макрофагов и гепатоцитов, что приводит к снижению уровня железа в крови [77].

Ферритин

Универсальным хранилищем железа в организме является белок ферритин, который присутствует в клетках всех тканей организма. Это олигомерный белок оболочечной структуры с октаэдрической симметрией 4/3/2. Форма белка напоминает клетку, стенки которой сформированы 4-х, 3-х и 2-х-субъединичными ячейками [78]. Через гидрофильные каналы, сформированные тремя субъединицами, назовём их треугольные, внутрь белка поступает железо, а через гидрофобные образованные четырьмя субъединицами, то есть четырехугольные, кислород, необходимый для окисления Fe^{2+} [79–83]. Тяжёлая субъединица ферритина обладает ферроксидазной активностью, тогда как легкая субъединица участвует в формировании ядра из гидроксида железа. Активный центр Н-ферритина человека состоит из шести аминокислот: Glu-61, Glu-62, His-65, Glu-107, Gln-141 и Glu-27 [83, 84]. Ионы двухвалентного железа Fe^{2+} входят в белок, взаимодействуя с кислыми аминокислотами, по треугольным гидрофильным каналам, а затем перемещаются к активному центру. Активный центр имеет два центра окисления железа. Два иона Fe^{3+} , взаимодействуя с активными формами кислорода, которые образуются при участии тяжёлой субъединицы в ходе окислительных реакций, образуют единый пероксокомплекс [84, 85]. Этот комплекс перемещается к месту минерализации, где медленно гидролизует и хранится в виде гидроксида железа. Эксперименты с заменой аминокислотных остатков показали, что основную роль в формировании минерального ядра играют открытые в полость олигомера аминокислотные остатки Glu-57, Glu-60 L-ферритина. Карбоксильные группы этих аминокислотных остатков способны формировать затравочные ядра гидроксида железа [28].

Соотношение Н- и L-субъединиц влияет на функцию белка и тип его минерального ядра. Комплекс, богатый L-субъединицами, медленно высвобождает железо (L-субъединицы ускоряют минерализацию), тогда как комплекс, богатый Н-субъединицами, обеспечивает быстрое поглощение и высвобождение ионов металлов [86]. В связи с этим

разные ткани содержат изоформы ферритина с разным соотношением субъединиц. Например, ферритин, богатый Н-субъединицами, находится в клетках мозга и сердца, которые активно используют железо [87]. В исследованиях *in vitro* оценили скорости поглощения и высвобождения железа ферритином: при образования минерального ядра 1200 молей Fe/моль ферритина/сек [33] и 0,52 моля Fe/моль ферритина/сек для высвобождения из белка [88].

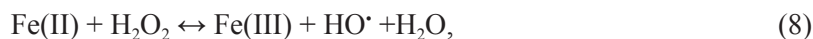
Механизм высвобождения железа из ферритина и его дальнейшего использования полностью не раскрыт. Однако, на основе анализа данных, полученных как *in vivo*, так и *in vitro*, можно выделить некоторые важные элементы этого процесса. Выход Fe²⁺ из ферритина зависит от сложного процесса восстановления и растворения, происходящего на поверхности железосодержащего ядра. Показано, что одноэлектронные восстановители, такие как флавиновые мононуклеотиды, аскорбат, глутатион способствуют этому процессу. Эти соединения проникают внутрь олигомера и восстанавливают Fe³⁺ до Fe²⁺ [89–93]. Выход железа происходит по каналам трёхкратной симметрии. Флуктуации в структуре каналов, определяемые, вероятно условиями краудинга, а также присутствием некоторых органических кислот, мочевины или пептидов, контролируют их открытие и закрытие [94, 95].

Краткий итог

Подводя итог анализа горячих точек в транспорте железа в организме, можно заключить, что передача иона железа происходит при образовании комплекса из белка донора и белка акцептора. Исключение составляет загрузка и выгрузка железа в ферритине. Свободный ион железа здесь появляется на стадии прохождения оболочки олигомера. Однако дальнейшая судьба его неясна. Сведений о том, что РСВР2 образует комплекс с ферритином для передачи иона железа, мне найти не удалось. Поэтому вполне вероятно, что железо, пока оно не связалось РСВР2, какое-то время находится в цитоплазме в виде свободного иона Fe²⁺. Можно ожидать, что некая «поломка» белка донора или белка акцептора — возникшая как следствие образования генетического дефекта, может нарушить процесс передачи иона железа и привести к появлению Fe²⁺ в цитоплазме клетки. Например, мутация в гене, кодирующим L-ферритин, то есть нарушающая способность ферритина формировать железное ядро, приводит к образованию не только наследственной врождённой катаракты, но и возрастной катаракты у человека. Механизм образования таких катаракт связан с развитием окислительного стресса в волоконных клетках хрусталика, вызывающего повреждение и агрегацию

белков кристаллинов [96, 97]. Аналогичные нарушения наблюдали и при нейродегенеративных заболеваниях. Было показано, что железное ядро ферритина из мозга здоровых людей состоит в основном из гексагонального ферригидрита, гематита и более мелкой фазы магнетита. Ядро ферритина из мозга людей больных болезнью Альцгеймера содержат кристаллическую фазу с большей магнитокристаллической анизотропией [98]. Такой магнитоферритин, получивший название патологического, состоит из кубических структур, таких как магнетит и вюстит. Сравнительное исследование показало, что у магнитоферритина способность к высвобождению железа в два – пять раз выше, чем у физиологического ферритина [99]. С помощью сверхчувствительного сверхпроводящего магнитометра было обнаружено присутствие ферромагнитного материала в различных тканях человеческого мозга. Исследование с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения, метода отражающей дифракции электронов и элементного анализа, показало, что ферромагнитный материал относится к семейству магнетит-магемита. При этом эти кристаллические структуры сильно напоминают структуры, которые наблюдаются у бактерий и рыб, способных к магнитотаксису [100].

Существующие на данный момент данные позволяют утверждать, что ионы Fe^{2+} могут появляться в цитоплазме клеток организма. Именно с избыточным уровнем биогенного железа связывают множество патологических процессов, включая воспаление [101], нейродегенерацию [102], нейровоспаление [103] и даже рак [104]. Более того, избыток железа также связывают с развитием заболеваний печени [105], сердца [106] и лёгких [107]. Однако, как известно, рН цитоплазмы близок к нейтральному, кроме того, в клетке присутствует кислород. Поэтому свободный ион Fe^{2+} в цитоплазме может как окисляться до Fe^{3+} , так и образовывать нерастворимый в воде гидроксид $Fe(OH)_2$ (таблица 1). Ещё в 1935 году Вайс [108] (цитируется по [109]) предложил схему окисления Fe^{2+} кислородом:



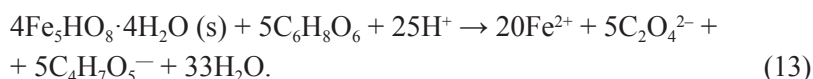
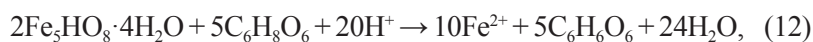
При этом гидроксид железа (II) окисляется легче, чем соответствующий ион, так как для этого необходимо только отделить электрон от электрически нейтрального вещества [110].

Таблица 1. Растворимость гидроксидов железа в воде при 25 °С

Реакция	Константа равновесия при 25 °С
$\text{Fe}(\text{OH})_2 = \text{Fe}^{2+} + 2\text{OH}^-$	$8 \cdot 10^{-16}$
$\text{Fe}(\text{OH})_2 = \text{Fe}(\text{OH})^+ + \text{OH}^-$	$4 \cdot 10^{-10}$
$\text{Fe}(\text{OH})_3 = \text{Fe}^{3+} + 3\text{OH}^-$	$\sim 10^{-36}$
$\text{Fe}(\text{OH})_3 = \text{Fe}(\text{OH})^{2+} + 2\text{OH}^-$	$6.8 \cdot 10^{-25}$
$\text{Fe}(\text{OH})_3 = \text{Fe}(\text{OH})_2^+ + \text{OH}^-$	$1.7 \cdot 10^{-15}$

Таким образом, свободный ион Fe^{2+} трансформируется в $\text{Fe}(\text{OH})_2$ и $\text{Fe}(\text{OH})_3$, молекулы которых могут образовывать полидисперсные частицы переменного состава похожие на ферригидритное ядро.

Возникает резонный вопрос, а не могут ли эти частицы в присутствии восстановителей, например аскорбиновой кислоты, восстановиться и вновь образовать свободный ион Fe^{2+} ? Юань с сотрудниками исследовали взаимодействие ферригидрита с аскорбиновой кислотой и предложили схему реакций для описания этого процесса [111]. Приведём часть из них непосредственно касающихся обсуждаемой проблемы:



Хорошо видно, что в образовании свободного иона железа участвуют ионы водорода, иными словами, для образования иона Fe^{2+} требуется кислая среда. Отметим также, что в экспериментах по высвобождению железа из ферритина с патологическим и физиологическим ядром, то есть ядер из магнетита и ферригидрита соответственно, исследовались не ядра, а, собственно, магнитоферритины и физиологические ферритины [99]. Это указывает, что внутри олигомера ферритина существуют особые условия, позволяющие аскорбиновой кислоте восстанавливать гидроксид железа. Поэтому на поставленный вопрос мы должны ответить отрицательно – образование свободного иона Fe^{2+} под действием восстановителей в цитоплазме вряд ли возможно.

Подведём итог. На основе существующих экспериментальных данных, можно утверждать, что появление свободного иона Fe^{2+} в цитоплазме клеток вполне возможно. Однако при нейтральных pH и в присутствии кислорода, Fe^{2+} будет образовывать гидроксид и окисляться. Образовавшиеся гидроксиды железа II и железа III будут формировать смешанные аморфные или кристаллические структуры. Таким образом, в своём классическом виде реакция Фентона (реакция 1) в клетке вряд ли возможна.

IV. РЕАКЦИЯ ФЕНТОНА *IN VITRO*

Для исследования процессов свободнорадикального окисления в условиях *in vitro* используются различные модельные системы. Например, это смесь пероксида водорода и солей железа, которую с 50х годов прошлого века называют реактивом Фентона [4]. Публикаций с использованием этого методического подхода несть числа, проанализировать их затруднительно, однако можно выделить некоторые основные принципы. В зависимости от окисляемого субстрата концентрация соли железа может варьировать от микромолярных до миллимолярных концентраций, а концентрация пероксида водорода от миллимолей до молей на литр. В некоторых случаях в качестве добавки использовали ЭДТА, при этом как для торможения, так и ускорения окисления [112–115].

Многие исследователи в частных беседах сетовали на плохую воспроизводимость результатов, когда для окисления биологических субстратов использовались смеси на основе солей железа. При этом для улучшения результата при приготовлении растворов порой использовались, можно сказать, ритуальные действия. Например, при взвешивании сернокислого железа надо было выбирать только голубоватые кристаллы, или наоборот кристаллы белого цвета.

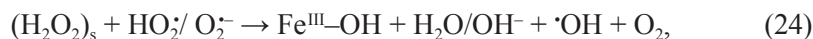
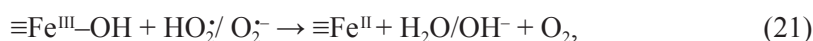
Основополагающая работа Генри Джона Фентона посвящена окислению винной кислоты, раствор которой имеет кислый pH. Более того, методика окисления включала добавление небольшими порциями серной кислоты [1]. А недавно было показано, что pH = 2,8 является оптимальным для реакции Фентона [116]. Это неудивительно, поскольку при нейтральных и щелочных pH ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} быстро образуют соответствующие гидроксиды. Гидроксиды железа практически нерастворимы в воде. Значения соответствующих констант диссоциации, приведённые в исследовании Стамма и Ли, представлены в таблице 1 [109].

При растворении в воде при нормальных условиях соли Fe^{2+} быстро окисляются растворенным в воде кислородом до Fe^{3+} . Ионы Fe^{3+} в свою очередь взаимодействуют с водой, образуя гидроксид:



Частицы гидроксида железа прилипают друг к другу, образуя сложную поликристаллическую структуру, которая зависит от ионного состава раствора [117]. При кислых значениях pH частицы гидроксида железа образуют прозрачный устойчивый золь красно-коричневого цвета. Частицы золя имеют диаметр около 10 нм [118, 119]. При подщелачивании раствора до нейтральных значений pH, частицы золя начинают слипаться. Вначале образуется аморфный осадок, который постепенно переходит в кристаллическую структуру. В результате получается смешанное вещество с переменной растворимостью, составом и степенью кристалличности [117, 119].

На поверхности этого осадка может происходить разложение пероксида водорода с образованием гидроксильного радикала. Эта реакция получила название Фентонподобной реакции. Лин и Гарол предложили механизм этой реакции на поверхности оксида железа в форме гётита [120]



где $\equiv\text{Fe}^{\text{III}}\text{OH}$ и $\equiv\text{Fe}\text{-OH}_2$ оксиды железа на поверхности минерала.

Анионы, присутствующие в растворе, ингибируют разложение пероксида водорода в ряду: $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$ [121]. Иными словами, солевой состав раствора может влиять на скорость разложения H_2O_2 и образование $\cdot\text{OH}$. Состав буферного раствора существенно влияет на размеры образующихся частиц гидроксида железа. Показано, чем меньше размер частиц, тем большей способностью к разложению пероксида водорода, т. е. пероксидазной активностью, они обладают. При этом активность уже сформированных частиц железа со временем не меняется [119].

Растворение солей железа не в воде, а непосредственно в буферном растворе сопровождается образованием осадка, который также способен разлагать пероксид водорода. К сожалению, в описании методики приготовления регента Фентона, не указывается порядок приготовления растворов. Но если предположить, что раствор соли железа приготавливался *ex tempore*, то нет ничего удивительного в получении больших разбросов при окислении биологических субстратов. Растворы, приготавливаемые в разное время, обладают различной пероксидазной активностью вследствие того, что размеры частиц гидроксида железа в таких препаратах сильно варьируют.

Для оценки скорости образования гидроксильного радикала при разложении пероксида водорода в присутствии железа используются косвенный методы, основанные на измерении количества продуктов взаимодействия гидроксильного радикала с молекулой-индикатором. В качестве таких молекул-индикаторов используют кумарин [122], 3,5,3',5'-тетраметилбензидин [123], *o*-фенилендиамин [124] или спиновую ловушку DMPO [125]. Поэтому количественные данные об активности, приведённые в литературе, могут существенно различаться. В таблице 2 представлены константы скорости реакции взаимодействия пероксида водорода с железом при различных pH. Отметим, что активность ферригидрита при слабощелочном pH близка к активности ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в кислой среде.

Таблица 2. Бимолекулярная константа скорости взаимодействия H_2O_2 с ионами Fe^{2+} , Fe^{3+} , гётитом и ферригидритом при различных pH*

Катализатор	k , $\text{M}^{-1}\cdot\text{сек}^{-1}$	pH
Fe^{2+}	0,044	2
Fe^{3+}	0,024–0,054	2
Гётит	0,0016	7,7
Ферригидрит	0,023	7,7

* – по данным исследования Лина и Гарола [120].

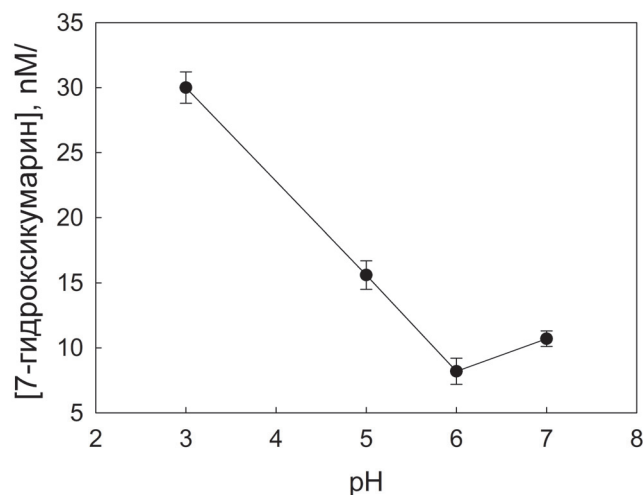


Рис. 4. Образование 7-гидроксикумарина в течение 72 часов в присутствии смеси пероксида водорода и ферригидрита при различных pH [121].

На рисунке 4 представлены результаты из исследования Лина и сотр. по накоплению флуоресцирующего производного кумарина – 7-гидроксикумарина в течение 72 часов под действием смеси пероксида водорода и ферригидрита при различных pH [121]. Хорошо видно, что защелачивание среды вызывает снижение скорости генерации гидроксильного радикала.

Вместе с тем, необходимо подчеркнуть, что сравнение пероксидазной активности ионов железа и различных форм железа в виде гидроксида может носить только характер иллюстрации. Напомним, что при вычислении константы скорости гомогенной реакции используются концентрации ингредиентов. В случае исследования ионов железа это условие выполняется. Однако при исследовании полиморфного осадка ферригидрита мы переходим в область гетерогенного катализа и оценить концентрацию активных центров, участвующих в реакциях с пероксидом водорода, невозможно.

Таким образом, можно утверждать, что в системах *in vitro* в условиях, когда кислотность среды соответствует кислотности в цитозоле, окисление биологических субстратов происходит по механизму Фентонподобной реакции. А именно в разложении пероксида водорода принимает участие не свободный ион железа, а железо в форме гидроксида.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы проанализировали пути транспорта железа в организме. В физиологических условиях железо перемещается в виде комплексов с различными транспортными белками, что вероятно было выработано в результате эволюционного процесса. Можно предположить, что такое эволюционное приобретение защищало организм от свободнорадикального повреждения с участием железа. В условиях патологического процесса белки-участники транспорта и хранения железа могут допускать сбой, и тогда ионы железа оказываются в цитозоле в свободной форме. Однако вследствие взаимодействия с ионом гидроксида, концентрация которого поддерживается в клетке на постоянном уровне, ионы железа образуют нерастворимые в воде гидроксиды. Гидроксиды железа, как $\text{Fe}(\text{OH})_2$, так и $\text{Fe}(\text{OH})_3$ способны катализировать разложение пероксида водорода с образованием гидроксильного радикала — активной частицы, запускающей процесс свободнорадикального повреждения различных субстратов, в том числе нуклеиновых кислот, белков и липидов. Разложение пероксида водорода с участием гидроксидов железа получила название Фентон-подобной реакции. Следует отметить, что механизм Фентон-подобной реакции в данный момент исследуется специалистами экологического профиля. В биологической системе протекание Фентон-подобной реакции должно иметь свои особенности, которые, я надеюсь, в скором времени будут предметом исследования биологов различного профиля.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Автор выражает благодарность д.х.н. Л.М. Писаренко (ИХФ РАН) за плодотворное обсуждение проблемы гетерогенного катализа с участием гидроксида железа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fenton H.J.H., LXXIII. – Oxidation of tartaric acid in presence of iron. (1894) *Journal of the Chemical Society, Transactions*, **65**, 899–910. doi:10.1039/CT8946500899.
2. Dakin H.D., (1922) *Oxidations and Reductions in the Animal Body*. 2th ed. Longmans Green and Co. <http://113.160.249.209:8080/xmlui/handle/123456789/11753>.
3. Tarr H.L.A., (1948) Control of Rancidity in Fish Flesh: II. Physical and Chemical Methods. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **7b**, 237–247. doi:10.1139/f47-025.
4. Zamenhof S., Griboff G., Marullo N., (1954), Studies on the resistance of desoxyribonucleic acids to physical and chemical factors. *Biochimica et Biophysica Acta* **13**, 459–470. doi:10.1016/0006-3002(54)90362-5.
5. Haber F., Weiss J., (1934), The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences*, **147**, 332–351. doi:10.1098/rspa.1934.0221.
6. Knutson M., Wessling-Resnick M., (2003) Iron metabolism in the reticulo-endothelial system. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 61–88. doi:10.1080/713609210.
7. Knutson M.D., (2017), Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 61–88. doi:10.1074/jbc.R117.786632.
8. Tenhunen R., Gräsbeck R., Kouvonen I., Lundberg M., (1980), An intestinal receptor for heme: Its partial characterization. *International Journal of Biochemistry*, **12**, 713–716. doi:10.1016/0020-711X(80)90149-4.
9. Gräsbeck R., Kouvonen I., Lundberg M., Tenhunen R., (1979), An Intestinal Receptor for Heme. *Scandinavian Journal of Haematology*, **23**, 5–9. doi:10.1111/j.1600-0609.1979.tb02845.x.
10. White C., Yuan X., Schmidt P.J., et al., (2013), HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metabolism*, **17**, 261–270. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.005.
11. Rajagopal A., Rao AU., Amigo J., et al., (2008), Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*, **453**, 1127–1131. doi:10.1038/nature06934.
12. Weintraub L.R., Weinstein M.B., Huser H.J., Rafal S., (1968) Absorption of hemoglobin iron: the role of a heme-splitting substance in the intestinal mucosa. *The Journal of clinical investigation*, **47**, 531–539/ doi:10.1172/JCI1105749.
13. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., et al., (1997), Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482–488. doi:10.1038/41343.
14. Fleming M.D., Trenor C.C., Su M.A., et al. (1997), Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*, **16**, 383–386. doi:10.1038/ng0897-383.
15. Gunshin H., Fujiwara Y., Custodio A.O., et al., (2005), Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1258–1266. doi:10.1172/JCI24356.
16. Shawki A., Anthony S.R., Nose Y., et al. (2015), Intestinal DMT1 is

- critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, **309**, G635–G647. doi:10.1152/ajpgi.00160.2015.
17. McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O., et al. (2001), An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, **291**, 1755–1759. doi:10.1126/science.1057206.
18. Shawki A., Engevik M.A., Kim R.S., et al. (2016), Intestinal brush-border Na⁺/H⁺ exchanger-3 drives H⁺-coupled iron absorption in the mouse. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, **311**, G423–G430. doi:10.1152/ajpgi.00167.2016.
19. Illing A.C., Shawki A., Cunningham C.L., Mackenzie B. (2012), Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 30485–3049. doi:10.1074/jbc.M112.364208.
20. Abboud S., Haile D.J., (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 19906–19912. doi:10.1074/jbc.M000713200.
21. Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., et al., (2000), Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776–781. doi:10.1038/35001596.
22. McKie A.T., Marciani P., Rolfs A., et al., (2000), A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, **5**, 299–309. doi:10.1016/S1097-2765(00)80425-6.
23. Mitchell C.J., Shawki A., Ganz T., Nemeth E., Mackenzie B., (2014) Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **306**, C450–C459. doi:10.1152/ajpcell.00348.2013.
24. Fuqua B.K., Lu Y., Darshan D., et al., (2014) The multicopper ferroxidase hephaestin enhances intestinal iron absorption in mice. *PLoS ONE*, **9**, e98792. doi:10.1371/journal.pone.0098792.
25. Yanatori, Y. Yasui, M. Tabuchi, and F. Kishi, (2014), Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochemical Journal*, **462**, 25–37. doi: 10.1042/BJ20140225.
26. Leidgens S., Bullough K.Z., Shi H., et al., (2013), Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 17791–17802. doi:10.1074/jbc.M113.460253.
27. Cozzi A., Corsi B., Levi S., Santambrogio P., Albertini A., Arosio P. (2000), Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: In vivo role of ferritin ferroxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25122–25129/ doi:10.1074/jbc.M003797200.
28. Santambrogio P., Levi S., Cozzi A., Corsi B., Arosio P. (1996), Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *The Biochemical journal*, **314** 139–144/ doi:10.1042/BJ3140139.
29. Svobodova H., Kosnáč D., Tanila H., et al. (2020), Iron–oxide minerals in the human tissues. *BioMetals*, **33**, 1–13. doi:10.1007/s10534-020-00232-6.
30. Andrews NC. (2012), Ferrit(in)ing out new mechanisms in iron homeostasis. *Cell metabolism*, **12**, 203–204. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.011.

31. Vanoaica L., Darshan D., Richman L., Schümann K., Kühn L.C. (2010), Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metabolism*, **12**, 273–282. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.003.
32. Darwich A.S., Aslam U., Ashcroft D.M., Rostami-Hodjegan A., (2014) Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, **42**, 2016–2022. doi:10.1124/dmd.114.058404.
33. Kidane T.Z., Sauble E., Linder M.C., (2006), Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **291**, 445–455. doi:10.1152/AJPCELL.00505.2005.
34. Gryzik M., Srivastava A., Longhi G., et al., (2017), Expression and characterization of the ferritin binding domain of Nuclear Receptor Coactivator-4 (NCOA4). *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1861**, 2710–2716. doi:10.1016/j.bbagen.2017.07.015.
35. Mancias J.D., Wang X., Gygi S.P., Harper J.W., Kimmelman A.C., (2014), Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, **508**, 105–109. doi:10.1038/nature13148.
36. Shi H., Bencze K.Z., Stemmler T.L., Philpott C.C., (2008), A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, NY)*, **320**, 1207–1210. doi:10.1126/SCIENCE.1157643.
37. Yanatori I., Yasui Y., Tabuchi M., Kishi F., (2014), Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochemical Journal*, **462**, 25–37. doi:10.1042/BJ20140225.
38. Yanatori I., Richardson D.R., Imada K., Kishi F., (2016), Iron export through the transporter ferroportin 1 is modulated by the iron chaperone PCBP2. *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 17303–17318. doi:10.1074/jbc.M116.721936.
39. Han O., Kim E.Y., (2007), Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **101**, 1000–1010. doi:10.1002/jcb.21392.
40. Yeh K., Yeh M., Glass J., (2011), Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion. *Gastroenterology*, **141**, 292–299. doi:10.1053/j.gastro.2011.03.059.
41. Harris W.R., (1986), Estimation of the ferrous-transferrin binding constants based on thermodynamic studies of nickel(II)-transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **27**, 41–52. doi:10.1016/0162-0134(86)80107-6.
42. Terpstra T., McNally J., Han T.H.L., Ha-Duong N.T., El-Hage-Chahine J.M., Bou-Abdallah F., (2014), Direct thermodynamic and kinetic measurements of Fe²⁺ and Zn²⁺ binding to human serum transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **136**, 24–32. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2014.03.007.
43. Bou Abdallah F., El Hage Chahine J.M.H., (1998), Transferrins. Hen ovo-transferrin, interaction with bicarbonate and iron uptake. *European journal of biochemistry*, **258**, 1022–1031. doi:10.1046/J.1432-1327.1998.2581022.X.
44. Wally J., Buchanan S.K., (2007), A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. In: *BioMetals*. **20**. 249–262. doi:10.1007/s10534-006-9062-7.
45. Dautry Varsat A., Ciechanover A., Lodish H.F., (1983), pH and the recycling of transferrin during receptor-

- mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 2258–2262.
doi:10.1073/pnas.80.8.2258.
46. Nunez M.T., Gaete V., Watkins J.A., Glass J., (1990), Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 6688–6692.
doi:10.1016/s0021-9258(19)39205-1.
47. El Hage Chahine J.M., Hémadi M., Ha-Duong N.T., (2012), Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1820**, 334–347.
doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.008.
48. Abbaspour N., Hurrell R., Kelishadi R., (2014), Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*, **19**, 164–74, PMC3999603.
49. Gottlieb Y., Truman M., Cohen L.A., Leichtmann-Bardoogo Y., Meyron-Holtz E.G., (2012), Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*, **97**, 1489–1493.
doi:10.3324/haematol.2012.063651.
50. Korolnek T., Hamza I., (2015), Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood*, **125**, 2893–2897.
doi:10.1182/blood-2014-12-567776.
51. Garby L., Noyes W.D., (1959), Studies on hemoglobin metabolism. II. Pathways of hemoglobin iron metabolism in normal man. *The Journal of clinical investigation*, **38**, 1484–1486.
doi:10.1172/JCI1103926.
52. Kristiansen M., Graversen JH., Jacobsen C., et al., (2001), Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, **409**, 198–201.
doi:10.1038/35051594.
53. Schaer C.A., Schoedon G., Imhof A., Kurrer M.O., Schaer D.J., (2006) Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation Research*, **99**, 943–950.
doi:10.1161/01.RES.0000247067.34173.1b.
54. Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P/W., et al., (2006), CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*, **107**, 373–380.
doi:10.1182/blood-2005-03-1014.
55. Hvidberg V., Maniecki M.B., Jacobsen C., Højrup P., Møller H.J., Moestrup S.K., (2005), Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, **106**, 2572–2579.
doi:10.1182/blood-2005-03-1185.
56. Vinchi F., Gastaldi S., Silengo L., Altruda F., Tolosano E., (2008) Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. *American Journal of Pathology*, **173**, 289–299.
doi:10.2353/ajpath.2008.071130.
57. Morgan E.H., Smith G.D., Peters T.J., (1986), Uptake and subcellular processing of ⁵⁹Fe-125I-labelled transferrin by rat liver. *Biochemical Journal*, **237**, 163–173, doi:10.1042/bj2370163.
58. Wang C.Y., Knutson M.D. Hepatocyte divalent metal-ion transporter-1 is dispensable for hepatic iron accumulation and non-transferrin-bound iron uptake in mice. *Hepatology*, **58**, 788–798.
doi:10.1002/hep.26401.
59. Nam H., Wang C.Y., Zhang L., et al., (2013), ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and

- overload: Implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica*, **98**, 1049–1057. doi:10.3324/haematol.2012.072314.
60. Grootveld M., Bell J.D., Halliwell B., Aruoma O.I., Bomford A., Sadler P.J., (1989), Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 4417–4422. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83758-9
61. Randell E.W., Parkes J.G., Olivieri N.F., Templeton D.M., (1994), Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 16046–16053. doi:10.1016/s0021-9258(17)33971-6.
62. Singh A., Kong Q., Luo X., Petersen R.B., Meyerson H., Singh N., (2009), Prion protein (PrP) knock-out mice show altered iron metabolism: A functional role for PrP in iron uptake and transport. *PLoS ONE*, **4**, e6115. doi:10.1371/journal.pone.0006115.
63. Shawki A., Knight P.B., Maliken B.D., Niespodzany E.J., MacKenzie B., (2012) H⁺-Coupled Divalent Metal-Ion Transporter-1: Functional Properties, Physiological Roles and Therapeutics. *Current Topics in Membranes*, **70**, 169–214. doi:10.1016/B978-0-12-394316-3.00005-3.
64. Mackenzie B., Takanaga H., Hubert N., Rolfs A., Hediger M.A., (2007), Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochemical Journal*, **403**, 59–69. doi:10.1042/BJ20061290.
65. Yanatori I., Richardson D.R., Toyokuni S., Kishi F., (2020), The new role of poly (rC)-binding proteins as iron transport chaperones: Proteins that could couple with inter-organelle interactions to safely traffic iron. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1864**, 129685. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129685.
66. Ghanem L.R., Kromer A., Silverman. I.M., et al., (2016), The Poly(C) Binding Protein Pcbp2 and Its Retrotransposed Derivative Pcbp1 Are Independently Essential to Mouse Development. *Molecular and Cellular Biology*, **36**, 304–319. doi:10.1128/mcb.00936-15.
67. Yanatori I., Kishi F., (2019), DMT1 and iron transport. *Free Radical Biology and Medicine*, **133**, 55–63. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.020.
68. Yanatori I., Richardson D.R., Toyokuni S., Kishi F., (2019), How iron is handled in the course of heme catabolism: Integration of heme oxygenase with intracellular iron transport mechanisms mediated by poly (rC)-binding protein-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **672**, 108071. doi:10.1016/j.abb.2019.108071.
69. Yanatori I., Richardson D.R., Toyokuni S., Kishi F., (2017), The iron chaperone poly(rC)-binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 13205–13229. doi:10.1074/jbc.M117.776021.
70. Jacobs A., (1977), Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood*, **50**, 433–439. doi:10.1182/blood.v50.3.433.433.
71. Philpott C.C., Ryu M.S., Frey A., Patel S., (2017), Cytosolic iron chaperones: Proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 12764–12771. doi:10.1074/jbc.R117.791962.

72. Petrak J., Vyoral D., (2005), Hefhaestin – A ferroxidase of cellular iron export. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **37**, 1173–1178.
doi:10.1016/j.biocel.2004.12.007.
73. Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y., Dmitriev O.Y., (2007), Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological Reviews*, **87**, 1011–1046.
doi:10.1152/physrev.00004.2006.
74. Schulz K., Vulpe C.D., Harris L.Z., David S., (2011), Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter. *Journal of Neuroscience*, **31**, 13301–13311.
doi:10.1523/JNEUROSCI.2838-11.2011.
75. Yeh K.Y., Yeh M., Mims L., Glass J., (2009), Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, **296**, G55–G65.
doi:10.1152/ajpgi.90298.2008.
76. Coffey R., Ganz T., (2017), Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 12727–12734.
doi:10.1074/jbc.R117.781823.
77. Drakesmith H., Nemeth E., Ganz T., (2015), Ironing out Ferroportin. *Cell Metabolism*, **22**, 777–787.
doi:10.1016/j.cmet.2015.09.006.
78. Sudarev V.V., Dolotova S.M., Bukhalovich S.M., et al., (2023), Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **224**, 319–343.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.126.
79. Arosio P., Carmona F., Gozzelino R., Maccarinelli F., Poli M., (2015), The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochemical Journal*, **472**, 1–15.
doi:10.1042/BJ20150787.
80. Ebrahimi K.H., Hagedoorn P.L., Hagen W.R., (2015), Self-assembly is prerequisite for catalysis of Fe(II) oxidation by catalytically active subunits of ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 26801–26810.
doi:10.1074/jbc.M115.678375.
81. Chen P., De Meulenaere E., Deheyn D.D., Bandaru P.R., (2020), Iron redox pathway revealed in ferritin via electron transfer analysis. *Scientific Reports*, **10**, 4033.
doi:10.1038/s41598-020-60640-z.
82. Laghaei R., Evans D.G., Coalson R.D., (2013), Metal binding sites of human H-chain ferritin and iron transport mechanism to the ferroxidase sites: A molecular dynamics simulation study. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **81**, 1042–1050.
doi:10.1002/prot.24251.
83. Bou-Abdallah F., Zhao G., Biasiotto G., Poli M., Arosio P., Chasteen N.D., (2008) Facilitated diffusion of iron(II) and dioxygen substrates into human H-chain ferritin. A fluorescence and absorbance study employing the ferroxidase center substitution Y34W. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 17801–17811.
doi:10.1021/ja8054035.
84. Bou-Abdallah F., (2010), The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1800**, 719–731.
doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.021.
85. Winterbourn C.C., (1995), Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, **82–83**, 969–974.
doi:10.1016/0378-4274(95)03532-X.
86. López-Castro J.D., Delgado J.J., Perez-Omil J.A., et al., (2012), A

- new approach to the ferritin iron core growth: Influence of the H/L ratio on the core shape. *Dalton Transactions*, **41**, 1320–1324. doi:10.1039/c1dt11205h.
87. Luzzago A., Arosio P., Iacobello C., et al., (1986), Immunochemical characterization of human liver and heart ferritins with monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, **872**, 61–71. doi:10.1016/0167-4838(86)90147-0.
88. Sala D., Ciambellotti S., Giachetti A., Turano P., Rosato A., (2017), Investigation of the Iron(II) Release Mechanism of Human H-Ferritin as a Function of pH. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **57**, 2112–2118. doi:10.1021/acs.jcim.7b00306.
89. Rousseau I., Puntarulo S., (2009), Ferritin-dependent radical generation in rat liver homogenates. *Toxicology*, **264**, 155–161. doi:10.1016/j.tox.2009.07.019.
90. Melman G., Bou-Abdallah F., Vane E., Maura P., Arosio P., Melman A., (2013), Iron release from ferritin by flavin nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1830**, 4669–4674. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.031.
91. Bou-Abdallah F., Paliakkara J.J., Melman G., Melman A., (2018), Reductive Mobilization of Iron from Intact Ferritin: Mechanisms and Physiological Implication. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **11**, 120. doi:10.3390/ph11040120.
92. Koochana P.K., Mohanty A., Parida A., et al., (2021), Flavin-mediated reductive iron mobilization from frog M and Mycobacterial ferritins: impact of their size, charge and reactivities with NADH/O₂. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **26**, 265–281. doi:10.1007/s00775-021-01850-2.
93. Koochana P.K., Mohanty A., Das S., et al., (2018), Releasing iron from ferritin protein nanocage by reductive method: The role of electron transfer mediator. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1862**, 1190–1198. doi:10.1016/j.bbagen.2018.02.011.
94. Tosha T., Behera R.K., Ng H.L., Bhattasali O., Alber T., Theil E.C., (2012), Ferritin Protein Nanocage Ion Channels. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 13016–13025. doi:10.1074/jbc.M111.332734.
95. Liu X., Jin W., Theil E.C., (2003), Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 3653–3658. doi:10.1073/pnas.0636928100.
96. Assia N., Goldenberg-Cohen N., Rechavi G., Amariglio N., Cohen Y., (2010), Mutation analysis of the ferritin L-chain gene in age-related cataract. *MolVis.*, **16**, 2487–2493. PMID: PMC2994742.
97. Yang Y., Lin T., Kuang P., Chen X., (2021), Ferritin L-subunit gene mutation and hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome (HHCS): a case report and literature review. *Hematology*, **26**, 896–903. doi: 10.1080/16078454.2021.1995111.
98. Bossoni L., Grand Moursel L., Bulk M., et al., (2017), Human-brain ferritin studied by muon spin rotation: A pilot study. *Journal of Physics Condensed Matter*, **29**, 415801. doi:10.1088/1361-648X/aa80b3.
99. Strbak O., Balejčikova L., Kmetova M., et al., (2020), Quantification of iron release from native ferritin and magnetoferritin induced by vitamins b2 and c. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1–15. doi:10.3390/ijms21176332.

100. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J., (1992), Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 7683–7687. doi:10.1073/pnas.89.16.7683.
101. Wessling-Resnick M., (2010), Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annual Review of Nutrition*, **30**, 105–122. doi:10.1146/annurev.nutr.012809.104804.
102. Hagemeyer J., Geurts J.J.G., Zivadonov R., (2012), Brain iron accumulation in aging and neurodegenerative disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **12**, 1467–1480. doi:10.1586/ern.12.128.
103. Frank-Cannon T.C., Alto L.T., McAlpine F.E., Tansey M.G., (2009), Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular neurodegeneration*, **4**, 47. doi:10.1186/1750-1326-4-47.
104. Jung M., Mertens C., Tomat E., Brüne B., (2019), Iron as a central player and promising target in cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 273. doi:10.3390/ijms20020273.
105. Milic S., Mikolasevic I., Orlic L., et al., (2016) The role of iron and iron overload in chronic liver disease. *Medical Science Monitor*, **22**, 2144–2151. doi:10.12659/MSM.896494.
106. Kobayashi M., Suhara T., Baba Y., Kawasaki N.K., Higa J.K., Matsui T., (2018), Pathological Roles of Iron in Cardiovascular Disease. *Current Drug Targets*, **19**, 1068–1076. doi:10.2174/1389450119666180605112235.
107. Ganz T., (2017), Does Pathological Iron Overload Impair the Function of Human Lungs? *EBioMedicine*, **20**, 13–14. doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.023.
108. Weiss J., (1935), Elektronenübergangsprozesse im Mechanismus von Oxydations- und Reduktionsreaktionen in Lösungen. *Die Naturwissenschaften*, **23**, 64–69. doi:10.1007/BF01497021/METRICS.
109. Stumm W., Lee G.F., (1961), Oxygenation of Ferrous Iron. *Industrial & Engineering Chemistry*, **53**, 143–146. doi:10.1021/IE50614A030.
110. Smythe C.V., (1931) The mechanism of iron catalysis in certain oxidations. *Journal of Biological Chemistry*, **90**, 251–265. doi:10.1016/S0021-9258(18)76678-7.
111. Yuan Z., Zhang G., Lin J., et al., (2019), The stability of Fe(III)-As(V) co-precipitate in the presence of ascorbic acid: Effect of pH and Fe/As molar ratio. *Chemosphere*, **218**, 670–679. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.142.
112. Khoshaman K., Yousefi R., Tamaddon A.M., Saso L., Moosavi-Movahedi A.A., (2015), The impact of Hydrogen peroxide on structure, stability and functional properties of Human R12C mutant alphaA-crystallin: The imperative insights into pathomechanism of the associated congenital cataract incidence. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **89**, 819–830. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.013.
113. Sreenivasan S., Rathore A.S., (2023), Combined Presence of Ferrous Ions and Hydrogen Peroxide in Normal Saline and In Vitro Models Induces Enhanced Aggregation of Therapeutic IgG due to Hydroxyl Radicals. *Molecular Pharmaceutics*, **20**, 3033–3048. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00051.

114. Roginsky V.A., Barsukova T.K., Bruchelt G., Stegmann H.B., (1997), Ion bound to ferritin catalyzes ascorbate oxidation: Effects of chelating agents. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1335**, 33–39.
doi:10.1016/S0304-4165(96)00120-1.
115. Wang K., Spector A., (1995), Alpha-crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress. *Investigative ophthalmology & visual science*, **36**, 311–321.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843902>.
116. Fischbacher A., Von S.C., Schmidt T.C., (2017), Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. *Chemosphere*, **182**, 738–744.
doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.039.
117. Grundl T., Delwiche J., (1993), Kinetics of ferric oxyhydroxide precipitation. *Journal of Contaminant Hydrology*, **14**, 71–87/
doi:10.1016/0169-7722(93)90042-Q.
118. Murphy P.J., Posner A.M., Quirk J.P., (1976), Characterization of partially neutralized ferric nitrate solutions. *JColloid Interface Sci*, **56**, 270–283.
doi:10.1016/0021-9797(76)90253-8.
119. Poliansky N.B., Motyakin M.V., Kasparov V.V., Novikov I.A., Muranov K.O., (2023), Oxidative damage to β L-crystallin in vitro by iron compounds formed in physiological buffers. *Biophysical Chemistry*, **294**, 106963.
doi:10.1016/j.bpc.2023.106963.
120. Lin SS., Gurol M.D., (1998), Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide on Iron Oxide: Kinetics, Mechanism, and Implications. *Environmental Science & Technology*, **32**, 1417–1423.
doi:10.1021/es970648k.
121. Lin Z.R., Zhao L., Dong Y.H., (2015), Quantitative characterization of hydroxyl radical generation in a goethite-catalyzed Fenton-like reaction. *Chemosphere*, **141**, 7–12.
doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.066.
122. Manevich Y., Held K. D., Biaglow J. E., (1997), Coumarin-3-carboxylic acid as a detector for hydroxyl radicals generated chemically and by gamma radiation, *Radiation Research*, **148**, 580–591.
doi: 10.2307/3579734.
123. Josephy P. D., Eling T., Mason R. P., (1982), The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates, *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 3669–3675.
doi: 10.1016/S0021-9258(18)34832-4.
124. Matsumoto T., Chang H-Ch., Wakizaka M., et al., (2012), Nonprecious-Metal-Assisted Photochemical Hydrogen Production from ortho-Phenylenediamine, *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 8646–8654.
doi: 10.1021/ja4025116.
125. Davies M. J., (2016), Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods, *Methods.*, **109**, 21–30.
doi: 10.1016/j.ymeth.2016.05.013.