

Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů

Pilotní studie

K. ŠVEJKOVSKÁ¹, I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ^{1,2}, K. DOUBKOVÁ¹, P. ŽIVNÝ¹,
E. ČERMÁKOVÁ³, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

²Radioizotopové laboratoře a Vivárium, LF UK a FN Hradec Králové

³Oddělení výpočetní techniky, UK v Praze, LF v Hradci Králové

SOUHRN

Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Doubková K., Živný P., Čermáková E., Palička V.: **Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů**

Cíl práce: Cílem této studie bylo sledovat ovlivnění kostního metabolismu opakovanými odběry krve a podáváním diety obohacené o železo u samců potkanů kmene Wistar.

Materiál a metody: Zvířata byla krmena buď standardní laboratorní dietou (SLD), nebo SLD obohacenou o železo: fe (SLD+400 mg elementárního železa/1 kg diety), FE+ (SLD+5 g elementárního železa/1 kg diety). Polovinu zvířat byl jednou týdně prováděn odběr krve (withdrawal = w) z retroorbitálních síní. Skupiny zvířat: 1. SLD (standardní laboratorní dieta), 2. SLD-w (SLD a opakované odběry krve), 3. fe (standardní laboratorní dieta obohacená o železo v dávce 400 mg/1 kg diety), 4. fe-w (SLD obohacená o železo v dávce 400 mg/1 kg diety a opakované odběry krve), 5. FE+ (standardní laboratorní dieta obohacená o železo v dávce 5 g/1 kg diety), 6. FE+w (SLD obohacená o železo v dávce 5 g/1 kg diety a opakované odběry krve). Byl vyšetřen krevní obraz, koncentrace železa, ferritinu a markery kostního obratu v séru: osteocalcin, N-terminální propeptid prokolagenu typu I, C-terminální telopeptid kolagenu typu I. Byla změřena hustota kostního minerálu (BMD), obsah vápníku a železa v kosti a biomechanické vlastnosti femuru (tříbodové ohýbání kosti, odolnost krčku femuru v tlaku).

Výsledky: Vlivem diety, obohacené o železo došlo k nárůstu koncentrace hemoglobinu (FE+ vs. fe, $p < 0,01$; fe vs. SLD, $p < 0,05$), hladiny železa v séru (FE+ vs. SLD, fe, $< 0,001$), obsahu železa a vápníku v kosti (FE+, fe vs. SLD, $< 0,001$) a k poklesu počtu erytrocytů (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$; fe vs. SLD, $p < 0,05$). Vlivem krevních odběrů klesl u SLD-w počet erytrocytů (vs. SLD, $p < 0,05$) a vzrostl obsah vápníku v kosti (vs. SLD, $p < 0,01$). U FE+w došlo k poklesu počtu leukocytů (vs. FE+, $p < 0,05$) a koncentrace železa (vs. FE+, $p < 0,05$). BMD celého femuru poklesla u skupiny fe-w vs. fe ($p < 0,05$).

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že zvířata dokázala po krátkou dobu trvání experimentu velmi dobře kompenzovat nejen opakované krevní ztráty, ale také nadbytek železa dodávaného potravou. Nedošlo k ovlivnění kostního metabolismu, ani ke změně biomechanických vlastností kostí.

Klíčová slova: železo, odběry krve, kostní markery, hustota kostního minerálu, biomechanické testování

SUMMARY

Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Doubková K., Živný P., Čermáková E., Palička V.: **Effect of repeated blood withdrawals and iron enriched diet on bone mechanical properties in rats**

Objective: The study aimed at assessing the effect of repeated blood withdrawals and iron-enriched diet on bone metabolism in male Wistar rats.

Material and methods: The rats were fed either with standard laboratory diet (SLD) or with iron-enriched diets. Half of the animals had blood withdrawn (w) from the retro-orbital sinus. The animal groups were as follows: (1) SLD, (2) SLD-w (SLD and repeated blood withdrawals), (3) fe (SLD enriched with iron at a dose of 400 mg/1 kg of the diet), (4) fe-w (SLD enriched with iron at a dose of 400 mg/1 kg of the diet and repeated blood withdrawals), (5) FE+ (SLD enriched with iron at a dose of 5 g/1 kg of the diet), and (6) FE+w (SLD enriched with iron at a dose of 5 g/1 kg of the diet and repeated blood withdrawals). Blood was analyzed for blood count, concentration of iron, ferritin and markers of bone metabolism: osteocalcin, procollagen type I N-terminal propeptide and C-terminal telopeptide of type I collagen. Subsequently, bone mineral density (BMD), calcium and iron content in bone and biomechanical properties of the femur (three-point bending, strength of the femoral neck) were measured.

Results: Iron-enriched diet increased the concentration of haemoglobin (FE+ vs. fe, $p < 0.01$; fe vs. SLD, $p < 0.05$) and serum iron (FE+ vs. SLD, fe, < 0.001), content of iron and calcium in bone (FE+, fe vs. SLD, < 0.001) and decreased erythrocyte count (FE+ vs. SLD, $p < 0.001$; fe vs. SLD, $p < 0.05$). Repeated blood withdrawals decreased erythrocyte count (SLD-w vs. SLD, $p < 0.05$) and increased the content of calcium in bone (SLD-w vs. SLD, $p < 0.01$). Leukocyte count ($p < 0.05$) and iron concentration ($p < 0.05$) were decreased in FE+w (vs. FE+). Total femoral BMD decreased in fe-w (vs. fe, $p < 0.05$).

Conclusion: The results suggest that the rats were able to compensate for not only repeated blood withdrawals but also iron-enriched diet very well. There were no changes in either bone metabolism or mechanical properties.

Keywords: iron, blood withdrawals, bone markers, bone mineral density, biomechanical testing

Osteologický bulletin 2011;16(4):141–147

Adresa: Mgr. Klára Švejková, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika, e-mail: klasvej@seznam.cz

Došlo: 22. 9. 2011

Schváleno: 15. 12. 2011

Úvod

Železo patří mezi mikrobiogenní neboli stopové prvky. Mikrobiogenní prvky se v organismu vyskytují v mikromolárních koncentracích a jsou pro organismus esenciální. Železo je významnou součástí řady enzymů, např. prolyl a lysyl hydroxylázy, 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylázy, ribonukleotid-reduktázy a řady dalších.

Nadbytek železa je pro organismus toxický a nedostatek naopak může vést ke vzniku řady onemocnění.

Nadbytek železa je pro organismus vysoce toxický z důvodu tvorby volných radikálů Fentonovou reakcí [1,2]. Mezi stavy s nadbytkem železa v organismu patří talasemie, srpkovitá anémie, africká sideróza, hereditární hemochromatóza (HHE), dále kouření, alkoholismus, HIV infekce a v neposlední řadě také zástava menstruačního krvácení. Až u 50 % těchto pacientů, kteří mají v organismu vyšší koncentrace železa, byla nalezena osteoporóza [3].

Flebotomie, neboli odběr 250 až 500 ml krve, je velmi efektivní a již přes 50 let používaný přístup v léčbě chorob se zvýšenou zátěží železem, jako je např. hemochromatóza [4]. Tato terapie stimuluje erytropoézu a mobilizuje železo ze zásobních míst. Snížení koncentrace železa redukuje potenciál pro vznik tkáňového poškození indukovaného železem, jako je jaterní fibróza, cirhóza a karcinom jater. Vysoká frekvence opakovaných odběrů krve (4x ročně) vede k poklesu zásob železa a s tím souvisejícího poklesu oxidačního stresu [5]. Chronické ztráty krve mohou ale z důvodu neustálé stimulace stromálního a hematopoetického systému vést k jeho vyčerpání, a stát se tak primárním faktorem rozvoje osteoporózy [6].

Kromě těchto léčebných forem se s flebotomií setkáváme u dobrovolných dárců krve, kteří jsou naopak ohroženi nedostatkem železa v organismu [7], a proto jsou často, převážně premenopauzální ženy, železem suplementovány.

Rovnováha železa v organismu je udržována pouze regulací absorpce z trávicího traktu. Organismus nedokáže odstranit nadbytečné železo jeho vyloučením, může pouze snížit jeho absorpci ve střevě. Proto musí být metabolismus železa, od jeho transportu přes buněčné membrány, distribuci v organismu a uchovávání v intaktní formě, dobře fungujícím mechanismem.

Buňky se liší svojí citlivostí k železu. Osteoblasty, které reprezentují kostní novotvorbu, jsou extrémně citlivé k přítomnosti železa. Železo jejich funkci potlačuje. Naopak osteoklasty resorbující kostní tkáň, jsou schopné fungovat správně i v přítomnosti nadbytku železa. Mezi další buňky, extrémně citlivé k nadbytku železa, patří buňky přední hypofýzy, což vede k nedostatku gonadotropinů s následným rozvojem osteoporózy [8].

Kostní metabolismus je hodnocen sledováním změn koncentrace kostních markerů: osteokalcinu, N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I a C-terminálního telopeptidu

kolagenu typu I. Osteokalcin (OC) je nekolagenní protein produkovaný osteoblasty, osteocyty a odontoblasty. K jeho tvorbě je zapotřebí kalcitriolu a vitamínu D. Vzniklý intaktní osteokalcin je absorbován do kostní matrix vazbou na hydroxyapatit pomocí reziduí γ -karboxyglutámové kyseliny. Část tohoto intaktního OC může být uvolněna do cirkulace. OC může také projít intracelulárními procesy, nebo být po sekreci degradován, proto je možné v cirkulaci detekovat řadu fragmentů: intaktní OC (1-45), C-terminální fragment (44-49), N-terminální fragment (1-19), MID fragment (20-43) a N-MID OC (1-43). Pro svou malou molekulu (6 kDa) snadno proniká glomerulem a má velmi krátký biologický poločas (4 min.).

Karboxy-terminální telopeptidy kolagenu typu I (CTX) jsou krátké aminokyselinové řetězce, které pocházejí z C-konce kolagenu a jsou vzájemně spojené pyridinolinovými molekulami, tzv. cross-linky. Během degradace kolagenu se uvolňují z kostní hmoty a mohou být detekovány v krevním séru. Mají však malou molekulu (9–20 kDa), a jsou tedy stejně jako OC vylučovány ledvinami.

Amino-terminální propeptidy prokolagenu typu I (PINP) se uvolňují z prokolagenu při syntéze kolagenu. Vzniklé propeptidy, jejichž molekula je bohatá na prolin a hydroxyprolin, jsou uvolňovány do krevního oběhu, kde mohou být detekovány. Sérová koncentrace N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I není ovlivňována funkcí ledvin, jako tomu je u CTx a OC, protože jeho molekulová hmotnost činí 70 kDa.

Cílem této studie bylo zjistit ovlivnění kostního metabolismu po 8 týdnech podávání diety obohacené o železo a po pravidelných odběrech krve u samců potkanů kmene Wistar. Byly sledovány koncentrace markerů kostního obratu, byla změřena hustota kostního minerálu a testována biomechanická odolnost femurů. Porovnávali jsme jak vliv jednotlivých typů diet, tak vliv opakovaných krevních odběrů u zvířat se stejným typem diety. Ve studii byli použiti samci potkanů, abychom se vyhnuli hormonálním změnám v průběhu experimentu. Železo bylo podáváno potkanům per os, abychom se co nejvíce přiblížili běžné klinické praxi suplementace železem.

Materiál a metody

Zvířata:

Experiment byl schválen Odbornou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (Č.j.: 24774/2006-11020). Samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, Česká republika) byli chováni za standardních podmínek: přístup k vodě a potravě *ad libitum*, cyklus 12 hodin světlo/tma, standardní pokojová teplota 22 ± 2 °C. Ve věku 8 týdnů byla zvířata rozdělena do šesti skupin po osmi. Pokus trval 8 týdnů, 2x týdně byla zaznamenávána hmotnost zvířat, spotřeba diety a vody.

Dieta:

Zvířata byla krmena buď standardní laboratorní dietou (SLD, VELAS, a. s., Lysá nad Labem, Česká republika) nebo standardní laboratorní dietou obohacenou o železo (fe, FE+). Železo bylo přidáváno do diety ve formě rozdrčených tablet (Sorbifer Durules, 100 mg Fe²⁺ a 60 mg kyseliny askorbové/1 tableta; EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapešť, Maďarsko). První typ SLD obohacené o železo (fe) obsahoval na 1 kg diety 400 mg elementárního železa a 240 mg kyseliny askorbové. Druhý typ SLD obohacené o železo (FE+) obsahoval na 1 kg diety 5 g elementárního železa a 3 g kyseliny askorbové.

Skupiny zvířat:

Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po osmi jedincích: 1. kontrolní skupina (SLD); 2. kontrolní skupina s opakovanými odběry krve (SLD-w); 3. skupina s fe dietou (fe); 4. skupina s fe dietou a opakovanými odběry krve (fe-w); 5. skupina s FE+ dietou (FE+); 6. skupina s FE+ dietou a opakovanými odběry krve (FE+w).

Pravidelné odběry krve:

V éterové narkóze bylo vybraným skupinám zvířat pravidelně jednou týdně odebíráno 1,5 ml krve. Krev byla odebírána pomocí heparinizovaných kapilár z retroorbitálních síní.

Ukončení studie:

Po 8 týdnech pokusu byla zvířata usmrcena v éterové narkóze odběrem krve z bifurkace břišní aorty. Plná krev byla použita k vyšetření krevního obrazu. Krevní sérum bylo použito ke stanovení koncentrace feritinu a koncentrace markerů kostního metabolismu: CTx, PINP a OC. Zvířatům byla dále odebrána játra, ledviny a slezina. Orgány byly zváženy a zamraženy v plastických sáčcích na -20 °C. Zvířatům byly poté odebrány oba femury, tibie a ocasní obratle. Odebrané kosti byly očištěny od měkké tkáně, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a uchovány při -20 °C.

Laboratorní vyšetření:

V Hematologické laboratoři Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové (LF UK a FN v HK), byl vyšetřen krevní obraz (Abbott CELL-DYN 3200 SL, Abbott, IL, USA). Koncentrace železa v séru byla stanovena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (ÚKBD) LF UK a FN v HK. Obsah železa a vápníku v kostní tkáni (tibie) byl změřen metodou atomové absorpční spektroskopie (ÚKBD LF UK a FN v HK).

V séru byla metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA) změřena koncentrace feritinu (RatFeritin, µg/l, Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA), dále markery kostního obratu: osteokalcin, N-terminální propeptid proko-

Tabulka 1

Koncentrace leukocytů, erytrocytů, hemoglobinu (Hb) a feritinu. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly ($p < 0,05$). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Průměr/medián	Leukocyty (10 ⁹ /l)	Erytrocyty (10 ¹² /l)	Hb (g/l)	Feritin (µg/l)
SLD	5,0 (3,8–7,1)	8,8 ± 0,2 *# P	147,4 ± 3,5 *	2 066,6 ± 302,1
SLD-w	3,7 (3,5–3,9)	8,5 ± 0,1 P	146,7 ± 2,9	1 863,7 ± 199,6
fe	7,8 (4,9–8,1)	8,5 ± 0,2 *	144,9 ± 4,8 *#	1 811,2 ± 204,1
fe-w	3,9 (3,7–7,7)	8,3 ± 0,3	145,4 ± 3,4	1 751,4 ± 352,5
FE+	6,7 (6,1–8,0) P	8,3 ± 0,2 #	152,1 ± 3,6 #	1 763,2 ± 490,9
FE+w	3,9 (3,5–5,0) P	8,2 ± 0,3	151,4 ± 3,9	1 716,5 ± 305,3

Tabulka 2

Obsah železa a vápníku v kosti, koncentrace železa. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly ($p < 0,05$). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Medián (25,-75, percentil)	Železo v kosti (nmol/kg)	Vápník v kosti (nmol/kg)	Železo v séru (µmol/l)
SLD	2,5 (1,9–2,8) *#	9 244,4 (8 556,6–9 484,5) *# P	40,6 (37,3–46,4) *
SLD-w	1,8 (1,7–2,0)	13 569,8 (10 888,8–14 255,7) P	34,5 (32,9–42,7)
fe+	4,4 (3,2–5,2) #	12 409,8 (11 275,4–14 873,2) #	44,8 (35,0–60,0) #
fe+w	2,8 (2,0–3,8)	13 632,5 (10 437,7–14 056,7)	41,3 (33,4–43,7)
FE+	4,9 (4,4–6,4) *	13 532,9 (11 212–17 118,4) * P	75,5 (57,8–85,8) *# P
FE+w	4,5 (4,0–5,1)	13 526,7 (11 923,7–14 858,7) P	54,2 (44,6–64,9) P

lagenu typu I a C-terminální telopeptid kolagenu typu I (Rat-MID Osteocalcin™, Rat/Mouse PINP, RatLaps™-CTX-I, µg/l, Immunodiagnostic Systems Ltd, Velká Británie).

Hustota kostního minerálu:

Kostní minerální hustota (BMD, g/cm²) byla změřena v Osteocentru LF UK a FN v HK pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). BMD byla vyhodnocena na izolovaném femuru, očištěném od měkké tkáně, který byl dále určen pro testování mechanické odolnosti. Všechny analýzy byly zpracovány pomocí vysokorozlišovacího softwaru, navrženého pro studium malých zvířat.

Biomechanické testování:

Testování biomechanických vlastností kostí bylo provedeno na speciálním zařízení, které bylo vyrobeno na zakázku (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika). Femury, které byly uchovávány při -20 °C, byly před testováním rozmrazeny (jedna hodina při pokojové teplotě) a převezeny na změření BMD na UKBD LF UK a FN HK. Abychom zabránili vysychání kostní tkáně, byly femu-

ry po celou dobu uchovávány zabalené v gáze zvlhčené fyziologickým roztokem. U každého femuru jsme před testováním změřili délku femuru, jeho tloušťku a označili jsme střed femuru. Při třibodovém testování mechanické odolnosti (three-point bending; 3PB) byly femury položeny na podpěry se zakulacenými hranami vzdálené od sebe 18 mm tak, aby jedna podpěra byla pod trochanterem major a druhá pod distální částí femuru. Třibodové testování bylo provedeno v anterioposteriorním (AP) směru (*obr. 1*). Před vlastním testováním mechanické odolnosti kostní tkáně byly femury zatíženy malým stabilizačním napětím (do 10 N) s použitím třetí podpěry. Tato čepel směřovala kolmo na dlouhou osu femuru a do středu mezi spodní podpěry. Následně byla kost zatížena rychlostí 6 mm/min dokud nedošlo k fraktuře. Síla potřebná ke zlomení kosti byla zaznamenána přístrojem (Digitalanzeiger 9180, Burster praezisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo). Na zlomeném femuru byla změřena mikrometrem (OXFORD 0-25mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie) tloušťka kompakty ve směru lámání, tedy v AP směru. Proximální část femuru byla dále použita pro testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku (*obr. 2*). Proximální část zlomeného femuru

byla upevněna svisle ve speciálně vyrobeném fixačním zařízení (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika) pomocí samopolymeryjící adhezivní pryskyřice (Spofacryl-SpofaDental, a. s., Jičín, Česká republika). Hlavice femuru byla zatěžována vertikální silou o rychlosti 6 mm/min pomocí podpěry s plochou hranou, dokud nedošlo ke zlomení krčku femuru. Maximální vyvinutá síla byla opět zaznamenána měřicí jednotkou.

Statistická analýza:

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). K posouzení významnosti byly použity testy: dvouvýběrový *t*-test, případně neparametrický Mann-Whitney, nebo Kolmogorov-Smirnov test s Bonferroniho modifikací. Data byla prezentována jako průměr a směrodatná odchylka nebo jako medián a percentily (25.–75.). Hodnota *p* < 0,05 byla považována za signifikantní.

Výsledky

Vliv diet:

Porovnávali jsme rozdíl mezi skupinami SLD, fe a FE+. Mezi statisticky významně zvýšené hodnoty vlivem diety se železem patří koncentrace hemoglobinu (FE+ vs. fe, *p* < 0,01, fe vs. SLD, *p* < 0,05) (*tab. 1*), koncentrace

Tabulka 3

Koncentrace kostních markerů. w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe. OC-osteokalcin, PINP-N-terminální propetid prokolagenu typu I, CTx-C-terminální telopeptid typu I.

Průměr/medián	OC (µg/l)	PINP (µg/l)	CTx (µg/l)
SLD	175,5 ± 65,2	37,8 ± 6,0	12,0 (9,9–13,7)
SLD-w	199,9 ± 34,9	39,3 ± 6,2	11,5 (10,6–13,2)
Fe	175,4 ± 46,1	35,7 ± 9,1	9,7 (8,1–11,7)
fe-w	210,1 ± 67,9	38,8 ± 7,9	11,2 (10,0–24,3)
FE+	199,2 ± 43,4	34,3 ± 8,7	10,9 (9,2–15,4)
FE+w	214,2 ± 61,0	39,7 ± 6,9	13,4 (11,0–14,9)

Tabulka 4

Kostní minerální hustota v hodnocených oblastech. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly (*p* < 0,05). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Průměr ± SD	BMD globalní (g/cm ²)	BMD diafýza (g/cm ²)	BMD proximální část (g/cm ²)
SLD	0,133 ± 0,054	0,122 ± 0,059	0,141 ± 0,054
SLD-w	0,085 ± 0,016	0,076 ± 0,021	0,092 ± 0,018
fe	0,110 ± 0,039 ^p	0,101 ± 0,038	0,119 ± 0,047
fe-w	0,083 ± 0,013 ^p	0,074 ± 0,017	0,084 ± 0,017
FE+	0,103 ± 0,041	0,093 ± 0,051	0,117 ± 0,037
FE+w	0,089 ± 0,010	0,087 ± 0,018	0,092 ± 0,019

železa v séru (FE+ vs. fe, SLD; $p < 0,001$), obsah železa v kosti a obsah vápníku v kosti (FE+, fe vs. SLD, $p < 0,001$) (tab. 2). Naopak počty erytrocytů vlivem obou diet se železem poklesly (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$; fe vs. SLD, $p < 0,05$) (tab. 1). Diety s různým obsahem železa nevedly ke změnám v hmotnosti zvířat, hmotnosti jater, koncentrace feritinu (tab. 1), koncentrace kostních markerů (tab. 3), hustoty kostního minerálu (tab. 4) ani mechanických vlastností kostí (graf 1 a 2).

Vliv opakovaných krevních odběrů u jednotlivých typů diet:

Porovnávali jsme rozdíl mezi skupinami: SLD vs. SLD-w, fe vs. fe-w a FE+ vs. FE+w.

U skupiny SLD-w došlo k významnému poklesu počtu erytrocytů ($p < 0,05$) (tab. 1) a vzrůstu obsahu vápníku v kosti ve srovnání s SLD ($p < 0,01$) (tab. 2). Skupina FE+w měla statisticky významný pokles v počtu leukocytů ($p < 0,05$) (tab. 1) a pokles v koncentraci železa ve srovnání s FE+ ($p < 0,05$) (tab. 2). Statisticky významný pokles BMD celého femuru byl zjištěn pouze u skupiny fe-w vs. fe ($p < 0,05$) (tab. 4). Opakované odběry krve nevedly ani u jedné ze sledovaných diet ke změnám v hmotnosti zvířat, hmotnosti jater, v koncentraci hemoglobinu a feritinu (tab. 1), nedošlo ke změnám v koncentraci kostních markerů (tab. 3), hustoty kostního minerálu (tab. 4), ani mechanických vlastností kostí (graf 1 a 2).

Diskuze

V naší studii jsme sledovali jak vliv suplementace železem na kostní metabolismus, tak vliv opakovaných krevních odběrů v kombinaci s dietou obohacenou o železo.

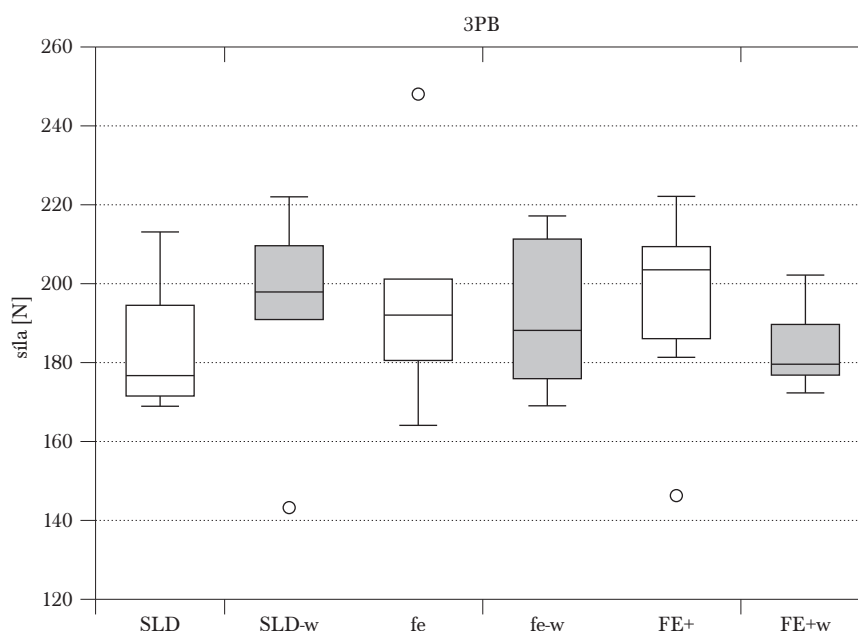
Vliv železa na metabolismus kostí:

V naší studii došlo vlivem diet se zvýšeným obsahem železa ke zvýšení hladin hemoglobinu, koncentrace železa v séru a obsahu železa a vápníku v kosti. Nedošlo ke změnám v hmotnosti zvířat, v počtu leukocytů, trombocytů ani v koncentraci feritinu (tab. 1).

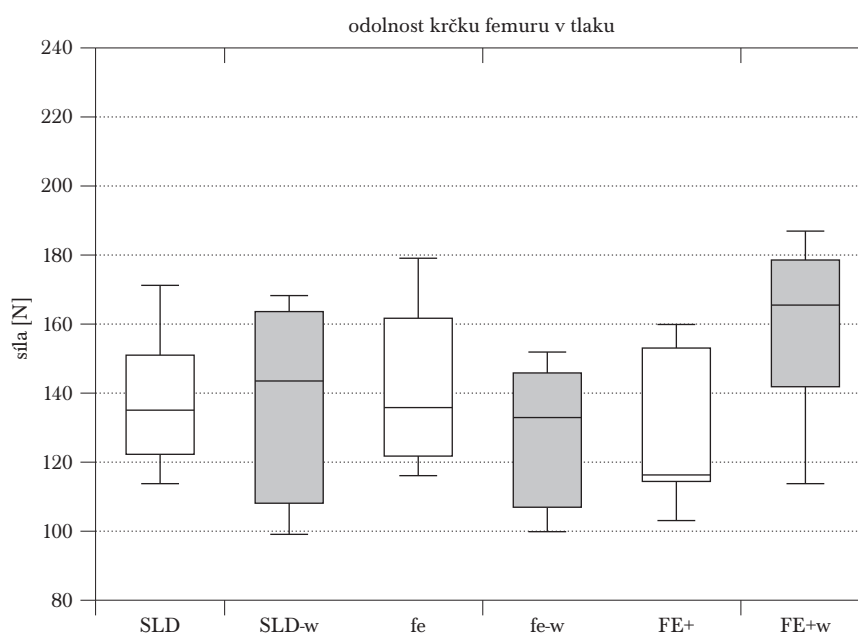
V této práci nedošlo k významným změnám v denzitě kostního minerálu vlivem diety obohacené o železo, je zde ale patrný trend k poklesu kostní minerální hustoty vlivem diet ve všech hodnocených částech femuru (tab. 4). Zajímavý je nárůst, i když opět nevýznamný, v pevnosti kosti vlivem diet

obohacených o železo při tříbodovém testování mechanické odolnosti (3PB) vs. SLD (graf 1). Vlivem těchto diet došlo k významnému zvýšení obsahu železa a vápníku v kostní hmotě ve srovnání se skupinou SLD (tab. 2). Tento náález by mohl souviset s hypotézou Guggenbuhla (2008) o vlivu železa na mineralizaci kostí. Autor předpokládá, že železo má přímý vliv na mineralizaci kostí, a tím na její kvalitu bez ohledu na buňky, proteiny a enzymy. Tento efekt je pravděpodobně způsoben inhibicí růstu a změnou kvality krystalů hydroxyapatitu *in vitro* [9]. Autor ve své dřívější studii našel negativní korelaci mezi koncentrací železa v játrech

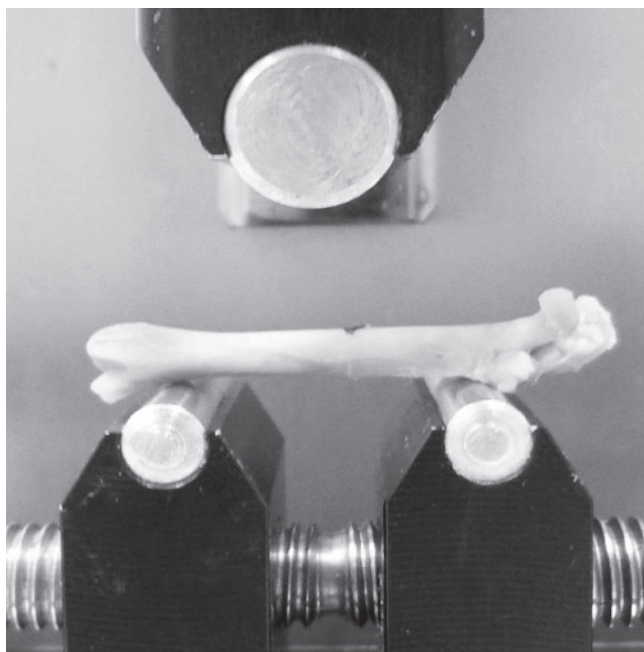
Graf 1
Tříbodové ohýbání diafýzy femuru



Graf 2
Testování odolnosti krčku femuru v tlaku



Obr. 1
Tříbodové ohýbání diafýzy femuru



Obr. 2
Testování odolnosti krčku femuru v tlaku



a BMD krčku femuru, nikoliv však u BMD bederních obratlů [10]. K podobným závěrům dospěl i Kudo (2008), v jehož studii vedlo předávkování železem k poklesu hmotnosti zvířat, k poklesu BMD v oblasti stehenní kosti, což dle autorů vede k následnému rozvoji osteoporózy. Existují však i studie, kde byla zjištěna pozitivní korelace mezi železem v dietě a BMD v oblasti bederních obratlů, trochanteru, krčku femuru, Wardova trojúhelníku a v celém těle [12].

V naší studii nedošlo ke změnám v koncentracích markerů kostního obratu – OC, PINP a CTx a ani v hodnotách biomechanického testování (graf 1 a 2). Zvýšení hladin jak

markerů kostní novotvorby, osteokalcinu a alkalické fosfatázy, tak markerů kostní resorpce, močového pyridinolinu a deoxypyridinolinu a pokles koncentrace parathormonu (PTH) pozoroval ve své studii s dietou obohacenou o železo Matsushima (2001). Objem kosti, tloušťka a počet trabekul ale poklesly. Autor se odkazuje na tvorbu hydroxylového radikálu, případně na přímý vliv iontu železa na enzym kostní resorpce, tartarát rezistentní kyselou fosfatázu. V další studii Matsushima (2003) zjistil zvýšené ukládání železitých iontů na povrchu kosti. Což je v souladu s naším nálezem zvýšeného obsahu železa v kostní tkáni vlivem diety obohacené o železo. V této studii autor pozoroval ztlustění stěn osteoidu a rozvoj osteomalacie. Rozdílné výsledky těchto dvou studií [2,13] odrážejí základní vlastnosti kostních buněk, tedy rychlé odbourávání kosti osteoklasty (po 2 a 4 týdnech na dietě) a pomalejší novotvorba kosti pomocí osteoblastů (po 13 týdnech na dietě).

Zvýšené ukládání železa v kostních buňkách, osteoblastech i osteoklastech, zjistil již v roce 1984 Vernejoul. Ovšem pouze uvnitř osteoblastů vedlo železo k poklesu počtu a aktivity těchto buněk, k poklesu odvodu osteoblastů a snížená byla i syntéza kolagenu. Tuto myšlenku potvrzuje nález osteoporózy až u 25 % pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) [15]. Vliv nadbytku železa na vznik osteoporózy potvrdil ve studii na buněčných kulturách také Yamasaki (2009).

Vliv opakovaných krevních odběrů a suplementace železem na metabolismus kostí

U dobrovolných dárců krve vedou odběry krve k prevalenci rozvoje deficitu železa v organismu [7], u žen k tomu vede již jeden jediný odběr, zatímco u mužů až pravidelné odběry [17]. V mnoha studiích byl prokázán pozitivní vliv suplementace železem na organismus [18,19,20]. Gurevitch (2007) ve své studii potvrdila, že chronické ztráty krve jsou primárním faktorem rozvoje osteoporózy pravděpodobně z důvodu vyčerpání stromálního a hematopoetického systému neustálou stimulací.

V naší studii došlo vlivem opakovaných odběrů krve ke statisticky významnému snížení počtu erytrocytů a leukocytů u SLD+w, ke snížení počtu leukocytů u skupiny FE+w (tab. 1) a k poklesu koncentrace železa v séru u skupiny FE+w (tab. 2) ve srovnání se skupinami bez opakovaných krevních odběrů. U všech skupin byl vlivem odběrů sledován stejný trend v poklesu hmotnosti zvířat, počtu erytrocytů, leukocytů, trombocytů a v poklesu koncentrace železa v séru. Výsledky ale nebyly statisticky významné.

U dobrovolných dárců krve se k posouzení stavu metabolismu železa a určení počtu bezpečných odběrů ročně jeví jako nejvhodnější sledování koncentrace hemoglobinu a ferritinu [18,20]. Změny v těchto parametrech jsme v naší studii nenalezli.

U pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) s osteoporózou bylo po provedení flebotomie prokázáno zlepšení stavu kostní hmoty (nárůst BMD) a to pravděpodobně mobilizací železa z kostí [15].

Pokles hustoty kostního minerálu celého femuru jsme pozorovali pouze u skupiny fe-w vs. fe. Zajímavým nálezem je zvýšený obsah vápníku v kosti u skupiny SLD-w vs. SLD.

Což opět podporuje hypotézu Guggenbuhla (2008), že s nárůstem množství železa v organismu klesá kvalita kostí a naopak. V ostatních parametrech hodnocení stavu kostní hmoty nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Vlivem odběrů je zde patrný, ale statisticky nevýznamný, trend v nárůstu hladin osteokalcinu a PINP, v poklesu obsahu železa v kosti, denzitě kostního minerálu ve všech hodnocených oblastech femuru a v poklesu hodnot 3PB u skupin s dietou se zvýšeným obsahem železa.

Z našich výsledků je patrné, že zvířata dokázala velmi dobře kompenzovat nadbytek železa přijímaného *per os* jeho sníženým vstřebáváním. Zároveň také dokázala velmi dobře kompenzovat pravidelné krevní ztráty pravděpodobně proto, že se jednalo o zdravé dospělé samce. V naší studii tedy nedošlo ke změně kostní hmoty, a tím k ovlivnění biomechanických vlastností kostí u potkanů kmene Wistar ani vlivem diety se zvýšeným obsahem železa, ani vlivem opakovaných krevních odběrů.

Seznam zkratk:

AP	anterioposteriorní
BMD	minerální hustota kostí
CTx	karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie
ELISA	enzymová imunoanalýza
HHE	hereditární hemochromatóza
NCSS	Number Cruncher Statistical System
OC	osteokalcin
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I
PTH	parathormon
RIL a VIV	Radioizotopové laboratoře a Vivárium
SLD	standardní laboratorní dieta
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
w	odběr krve (blood withdrawal)
3PB	tříbodové testování mechanické odolnosti

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a SVV 2010–62051.

Literatura

1. Isomura H, Fujie K, Shibata K, Inoue N, Iizuka T, Takebe G, Takahashi K, Nishihira J, Izumi H, Sakamoto W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology* 2004;197(2):93–100.
2. Matshushima S, Hoshimoto M, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron Lactate-Induced Osteopenia in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Pathol* 2001;29(6):623–629.
3. Weinberg ED. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biomaterials* 2006;19(6):633–635.
4. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. *Blood* 2010;116(3):317–325.
5. Zheng H, Cable R, Spencer B, Votto N, Katz SD. Iron Stores and Vascular Function in Voluntary Blood Donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(8):1577–1583.
6. Gurevitch O, Khitrin S, Valitov A, Slavin S. Osteoporosis of hematologic etiology. *Exp Hematol* 2007;35(1):128–136.
7. Cançado RD, Chiattoni CS, Alonso FF, Langhi DM Júnior, Alves R de C. Iron deficiency in blood donors. *Sao Paulo Med J* 2001;119(4):132–134.
8. Weinberg ED. Role of iron in osteoporosis. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6(suppl. 1):81–85.
9. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabilieu G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;57(7):903–910.
10. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, Chalès G. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int* 2005;16(12):1809–1814.
11. Kudo H, Suzuki S, Watanabe A, Kikuchi H, Sassa S, Sakamoto S. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology* 2008;246(2–3):143–147.
12. Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, Parkhill C, Weber JL, Flint-Wagner H, Weiss L, Going SB, Lohman TG. Dietary Iron Is Associated with Bone Mineral Density in Healthy Postmenopausal Women. *J Nutr* 2003;133(11):3598–3602.
13. Matshushima S, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron Lactate-Induced Osteomalacia in Association with Osteoblast Dynamics. *Toxicol Pathol* 2003;31(6):646–654.
14. Vernejoul de MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, Miravet I. Effect of iron loading on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol* 1984; 116(3):377–384.
15. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int* 2009;20(4):549–555.
16. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett* 2009;191(2–3):211–215.
17. Javadzadeh SH, Attar M, Taher YM. A study of the prevalence of iron deficiency and its related factors in blood donors of Yazd, Iran, 2003. *Transfus Med* 2005; 15(4):287–293.
18. Mittal R, Marwaha N, Basu S, Mohan H, Kumar A. Evaluation of iron stores in blood donors by serum ferritin. *Indian J Med Res* 2006;124(6):641–646.
19. Maghsudlu M, Nasizadeh S, Toogeh GR, Zandieh T, Parandoush S, Rezayani M. Short-term ferrous sulfate supplementation in female blood donors. *Transfusion* 2008;48(6):1192–1197.
20. Røsvik AS, Hervig T, Wentzel-Larsen T, Ulvik RJ. Effect of iron supplementation on iron status during the first week after blood donation. *Vox Sang* 2010; 98:249–256.
21. Djalali M, Neyestani TR, Bateni J, Siassi F. The effect of repeated blood donations on the iron status of Iranian blood donors attending the Iranian blood transfusion organization. *Int J Vitam Nutr Res* 2006;76(3):132–137.