

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biochemických věd



**Možnosti stanovení železa atomovou
absorbční spektrofotometrií u potkanů**
(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce

Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Hradec Králové, 2009

Soňa Hubená

Poděkování

Úvodem bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Pavlovi Živnému CSc., který se stal mým školitelem a pomohl mi úspěšně dokončit tuto práci. Zasloužil se velice ochotně do problematiky klinické biochemie a umožnil mi také zapojit se do provozu v biochemických laboratořích FN v Hradci Králové. Dále prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc. Dr.h.c., přednostovi Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové za vytvoření podmínek pro vypracování diplomové práce. Touto cestou bych ráda poděkovala i paní Martě Michajlíkové, která mi pomohla s praktickou částí. A v neposlední řadě bych také ráda poděkovala PharmDr. Magdaléně Holečkové.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně a že jsem použila uvedenou literaturu.

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřená na metabolismus železa a možnosti jeho stanovení. Důležitost metabolismu železa v organismu zatím nebyla dostatečně vysvětlena a to převážně v podmínkách opakovaných odběrů krve. Vztah mezi železem a procesy nespecifické imunity je velmi důležitý pro obranu organismu vůči infekci.

Hlavní otázka řešená v této studii byla efekt opakovaných odběrů krve a změna stravy na metabolismus železa se specifickým zřetelem na pohlaví. Snažili jsme se respektovat složitost celého procesu darování krve v lidských podmínkách (tzn. stresující proces, prohlídka doktorem, bodnutí jehlou a nakonec ztráty železa). Tento pokus ukazuje, že potkani výborně tolerují ztrátu krve. Předposlední odběr byl proveden 7 dní před odběrem orgánů, aby jsme zabezpečili dostatečné kompenzační období krevních ztrát. Nicméně předpokládáme, že opakované odběry krve doprovázené nevyhnutelnými ztrátami železa byly příčinou zvýšeného obratu železa se zvýšenými koncentracemi sérového železa.

Specifickou reaktivitu u testovaných samic je těžké převést do lidské medicíny, protože samičky potkanů neztrácejí pravidelně krev menstruací. Nicméně samičky potkanů mají mnoho těhotenství, které trvá 21 dní, kdy laktace a další schopnost otěhotnět začíná okamžitě po porodu. Železo se ztrácí převodem do plodu, placenty a mléka. Samička s tělesnou hmotností 350 g je schopna být matkou novorozenců se společnou porodní vahou 600g ročně.

Diplomová práce má 73 stran. Vycházela jsem z odborných článků a odborné literatury (viz seznam použité literatury). Práce je systematicky rozdělena do osmy kapitol, ve kterých přibližuji komplexní pohled na metabolismus železa a jeho stanovení. První a druhou kapitolu jsem věnovala metabolismu železa, regulací a jejich poruchami. Ve třetí kapitole popisují metodiku ke stanovení železa.

Čtvrtá kapitola je věnována praktické části, kde najdeme podrobněji popsaný postup experimentu. V páté a šesté kapitole shrnuji výsledky mé diplomové práce.

Abstract

Graduation theses is focused on iron metabolism and ways of its assesment. The importance of iron metabolism wasn't explained enough mainly under the condistions of regular blood withdrawals. Relationship between iron metabolism and processes of non-specific Immunity is very important in the defence against infection.

Main question discussed in this study was the effect of regular blood withdrawals and diet change on iron metabolism keeping sex in considaration. We tryed to respect the complexity of blood donation process under human conditions (stress, examination, needle puncture, blood loss). This test show that rats easily tolarate blood losses. Next to last withdrawal was accomplished 7 days before organ extraction to ensure compensatory period. We presume, that regular blood withdrawals accompanied by blood losses were the cause of higher iron serum levels.

It is difficult to transfer specific reaktivty of tested females into human medicine, because rat females doesn't lose blood due to menses. However rat females have multiple pregnancies, which last 21 days when lactation and the ability to impregnate begins right after delivery. Iron is lost when transferred into fetus, placenta and milk. Female with body weght of 350 g is capable of giving birth of newborns with total weight of 600g.

Graduation theses has 73 pages. Study issued from scientific articles and specialist literature. (see Used literature list) Study is divided systematicly into 8 chapters in which I explain complex insight i n iron matabolism and its assesment. The first and second chapter is dedicated to iron metabolism, regulation and its disorders. In third chapter I describe methods used in assesment of iron. Forth chapter is dedicated to practical part, where we can find detailed information about the experiment. In fifth and sixth chapter you can find the summary of

results.

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	12
2.1. Železo v organismu.....	12
2.2. Toxicita železa.....	12
2.3. Funkce železa.....	13
2.4. Vstřebávání železa.....	14
2.4.1. Ovlivnění absorpce železa.....	17
2.5. Metabolismus železa.....	19
2.6. Recyklace železa.....	22
2.7. Osud železa v buňkách.....	22
2.8. Regulační systémy metabolismu železa.....	23
2.8.1. Heparin.....	24
2.9. Poruchy metabolismu železa.....	27
2.9.1. Nadbytek železa.....	27
2.9.2. Nedostatek železa.....	30
3. Metody ke stanovení železa.....	33
3.1. Elektromagnetické záření.....	34
3.2. Atomová spektra.....	35
3.3. Z historie atomové spektrometrie.....	37
3.4. Atomová absorpční spektrometrie.....	39
3.4.1. Přístrojové zařízení.....	39
3.4.1.1. Zdroje primárního záření.....	40
3.4.1.2. Optický systém.....	42
3.4.1.3. Atomizátor.....	43
3.4.1.4. Monochromátor.....	43
3.4.1.5. Detektor.....	43
3.4.2. Využití.....	45
3.4.3. Plamenová absorpční spektrometrie.....	45
3.4.4. AAS s elektronovou atomizací.....	46
3.5. Atomová emisní spektrometrie.....	47
3.5.1. Analytické aplikace.....	48

3.5.2. Přístroje emisní spektrometrie.....	49
3.5.2.1. Budící zdroje.....	49
3.5.2.2. Monochromátorem.....	52
3.5.2.3. Detektor.....	52
4. Praktická část.....	54
4.1. Příprava vzorků.....	54
4.1.1. Příprava diety.....	54
4.2. Princip metody.....	55
4.3. Materiály.....	56
4.4. Postup.....	57
4.4.1. Mineralizace vzorků tkání.....	57
4.4.2. Měření v atomizátoru.....	57
4.5. Vyhodnocení.....	57
5. Diskuze.....	61
6. Závěr.....	63
7. Seznam použitých zkratek.....	64
8. Literatura.....	66

1. Úvod

Železo je esenciální prvek pro všechny živé organizmy. Obecně je známo, že v organismu hraje důležitou úlohu hned v několika biologických procesech. Fyziologie a patofyziologie metabolismu železa je multifaktoriální proces a to jak etiologicky tak i samotným mechanismem, který je komplexní, složitý a odehrává se ve více krocích s mnohými variabilními zpětnými vazbami.

Volné železo je velmi reaktivní a jeho nadbytek může vést k poškození tkání a orgánů. Protože neexistuje mechanismus vylučování železa z těla, je jeho absorpce ve střevě za fyziologických okolností přísně regulována. Pokrok v metodických přístupech umožnil identifikaci mnoha genů a proteinů podílejících se na absorpci železa a pochopení základních procesů jeho příjmu, transportu a skladování na buněčné úrovni. Přesto však stále nejsou některé pochody úplně objasněny. Mnoho nejasného zůstává hlavně v otázce regulace příjmu železa v závislosti na potřebách organismu.

Poruchy metabolismu železa, jak ve smyslu jeho deficitu tak nadbytku, jsou poměrně častým onemocněním. Rostoucí znalosti o fyziologickém metabolismu železa jsou rychle reflektovány do pokroků v diagnostice, preventivním screeningu a terapii jeho poruch.

Cílem této práce bylo zjistit, zda pravidelné odběry krve a množství železa ve stravě u potkanů vedou ke změně fyziologických procesů zapojených do nákládání s železem a zda jsou rozdíly mezi samci a samicemi. Pro měření obsahu železa v tkáních jsme zvolili metodu atomové absorpční spektrometrie s bezplamenovou atomizací, která má vyšší citlivost.

Introduction

Iron is an essential element for all living organisms. In general, iron has crucial role in multiple biological processes in organism. Physiology and pathophysiology of iron metabolism is a multifactorial, complex process that takes place in different steps with many variable feedbacks.

Free iron is very reactive and it's abundance can lead to tissue and organ damage. Absorption of iron in small intestine is strictly regulated, because there is no mechanism for it's excretion. Latest improvements in methodic approaches allowed the identification of various genes and proteins involved in iron absorption and understanding of basic processes of it's intake, transport and storage on the cellular level. Though, some processes remain unclear, mainly in the question of iron intake regulation dependent on the needs of organism.

Iron metabolism disorders are relatively frequent affections. Growing knowledge of physiologic iron metabolism is reflected in advancements in diagnostics, preventive screening and therapy of it's disorders.

The aim of this study was to find out if regular blood withdrawals and amount of dietary iron change physiological processes involved in iron metabolism and if there is some difference between male and female. To measure tissue organ levels we used the method of atom absorption spectrometry with flameless atomization which has higher sensitivity.

2. Teoretická část

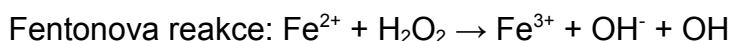
2.1. Železo v organismu

Železo je nepostradatelný mikronutrient, který hraje důležitou roli v řadě reakcí metabolismu (OATES PS, AHMED U, 2007). Řadí se mezi esenciální stopové prvky. Je důležitý pro všechny formy života, ale zároveň je pro ně i vysoce toxický (RACEK J, 2008).

Lidské tělo potřebuje ke své normální funkci asi 1-2 mg železa denně a jediný způsob jeho přijímání je stravou. Jelikož ho lidé neumí aktivně vyloučit, je jedinou možností ovlivnění jeho množství v těle na úrovni tenkého střeva (DARSHAN D, ANDERSON GJ, 2007).

2.2. Toxicita železa

Železo je pro svou schopnost katalýzy vzniku volných radikálů a následné poškození tkání oxidačním stresem potenciálně nebezpečné. Volné železité ionty jsou redukovány superoxidem a následné železnaté produkty jsou opět peroxidem reoxidovány. Vzniká tak množství hydroxylových radikálů způsobujících permanentní poškození biologických makromolekul. Reakce při kterých volné radikály vznikají se označují Fentonova a Haber-Weissova.



(WARDMAN ET AL, 1996)

Železo také zvyšuje riziko infekčních komplikací, protože je esenciálním nutrientem pro řadu patogenů. Vysoce virulentní patogeny jsou charakterizovány potentními mechanizmy vylučování železa

hostitele, jako je hemolýza s asimilací hemu, siderophory k vyvázání železa transferinu, absorpce intracelulárního železa hostitelských buněk (WEINBERG ET AL, 1995). Proto je důležitá regulace vstřebávání a metabolismu železa na úrovni buněk a organismu (VOKURKA M, 2006) a řada dalších obranných mechanismů, sloužících k vyvázání volného železa. V tělních tekutinách jsou přítomny proteiny schopné vázat volné železo jako transferin v plazmě, lymfě a mozkomíšním moku, lactoferin v tělních sekretech a feritin v buňkách (WEINBERG ET AL, 1996).

2.3. Funkce železa

Železo je součástí mnoha látek, které mají klíčové funkce v oxidativním metabolismu, syntéze i degradaci životně důležitých látek, množení buněk atd (VOKURKA M, 2006). Pro svou schopnost snadno přijímat a uvolňovat elektrony je důležitou součástí řady cytochromů a enzymů (WARDMAN ET AL, 1996). Zdaleka nejvíce je ho vázáno v hemu, a to v krevním barvivu hemoglobinu, kde se podílí na přenosu kyslíku a oxidu uhličitého mezi plícemi a cílovými tkáněmi. Existují desítky dalších hemoproteinů a enzymů (myoglobin, cytochromy dýchacího řetězce i enzymy podílející se m.j. na detoxikaci v játrech – P450 aj.), které hem, resp. železo obsahují nebo vyžadují ke své funkci (VOKURKA M, 2006). Jako součást myoglobinu se podílí na zásobování kyslíku využitelného při svalové činnosti. Vlastně mu vděčíme za účinný oxidativní způsob získávání energie. Jako součást cytochromů hraje klíčovou roli transportu elektronů v buňce, jehož důsledkem je vznik ATP, který následně slouží jako využitelná energie (KOTRBÁČEK V, 2007). Důležité je svou funkcí i železo nehemové, např. pro syntézu DNA (funkce v ribonukleotidreduktáze), nebo-li pro dělení buněk (VOKURKA M, 2006). Hraje důležitou roli v regulaci teploty. Vztah železa a mědi může ovlivnit fungování štítné žlázy, což je

důležitý faktor v regulaci tělesné teploty, která má vliv na schopnost tkání tvořit ATP (LITWACK G, 2008). Důležitá je i jeho přítomnost v systému neurotransmiterů v mozku, které výrazně ovlivňují dopaminergní systém jehož role je ve vnímání, paměti, kontrole motorických reakcí a neuroendokrinních regulacích. Železo sehrává také pozitivní úlohu v procesu stárnutí organismu, kde se jako součást enzymů podílí na likvidaci peroxidů, a tím i na ochraně buněčných membrán. Nemalý význam má také při obraně organismu před infekcí (KOTRBÁČEK V, 2007).

2.4. Vstřebávání železa

Přísun železa z řady potravin, které jsou potencionálně bohaté na železo, je limitován biologickou dostupností, která závisí na jeho chemické formě a přítomnosti dalších biologicky aktivních látek v potravě a vlastním způsobu přípravy pokrmů. I další ingredience, které se do pokrmů přidávají ovlivňují jeho vstřebávání (JAMES D COOK ET AL, 1991). Strava obsahuje jak hemové tak nehemové železo (LITWACK G, 2008). Vstřebávání hemového železa je facilitováno přítomností živočišných bílkovin a inhibováno přítomností kalcia (JAMES D COOK ET AL, 1991). Zatímco absorpce nehemového železa je negativně ovlivněna přítomností hemicelulózy, celulózy, pektinu, fytátů v pšeničných a sójových produktech. Také nadbytek divalentních kationtů jako jsou olovo, kobalt, stroncium, mangan, zinek inhibuje vstřebávání železa kompetitivním mechanismem na divalentním metalovém transportéru 1 (PICARD ET AL, 2000). Denně se ztrácí cca 1-2 mg železa a tyto ztráty se průběžně musí doplňovat vstřebáním z potravy. Železo se ztrácí odlupováním buněk z povrchu těla a ze sliznice trávicího ústrojí a při nefyziologických procesech jako je krvácení, u žen jsou ztráty výraznější při menstruaci, těhotenství a porodu a při kojení (VOKURKA M, 2006).

Střevní absorpce železa je vysoce regulovaný a komplexní proces (DARSHAN D, ANDERSON GJ, 2007), o kterém se někteří vědci domnívají, že zahrnuje kaskádový mechanismus podobný mechanismu srážení krve. Vitamín C zvyšuje absorpci nehemového železa redukcí potravinového Fe^{3+} na Fe^{2+} a tvorbou vstřebávatelného komplexu vitamín C - železo. Pro uvolnění Fe^{3+} z přijaté potravy je potřebná tvorba žaludeční kyseliny (LITWACK G, 2008), která zajišťuje nízké pH žaludečního obsahu, díky kterému se zvýší rozpustnost železa redukcí železité formy na železnatou a denaturací bílkoviny s navázaným železem (JAMES D COOK ET AL, 1991).

Proces absorpce železa lze rozdělit do tří fází:

- a) vychytávání železa enterocytem,
- b) intraenterocytární transport,
- c) extraenterocytární transport (JAMES D COOK ET AL, 1991).

Vlastní mechanismus vychytávání železa enterocytem je odlišný pro hemové a nehemové železo. Hem je rozpustný v alkalickém prostředí a po navázání na receptor transportního systému enterocytu tzv. HCP 1 dochází k jeho přijetí a následnému rozštěpení na biliverdin, oxid uhličitý a železo pomocí hemoxygenázou (SHAYEGHI ET AL, 2005). Trojmocné nehemové železo navázané do komplexů (PICARD ET AL, 2000) se redukuje feri-reduktázou neboli DCYTB na dvojmocnou formu, která se následně absorbuje (ANDERSON GJ, FRAZER DM, 2005). Hlavním místem absorpce železa z potravy je dvanáctník a horní jejunum, kde je jeho transport přes střevní epiteliální buňky umožněn divalentním transportérem kovu tzv. DMT1. Pro správnou funkci transportéru DMT1 je důležitá jeho transmembránová doména 4 (LITWACK G, 2008). Ale DMT 1 není specifický jen pro železo, může transportovat řadu dvojmocných iontů a v případě jejich nadbytku může

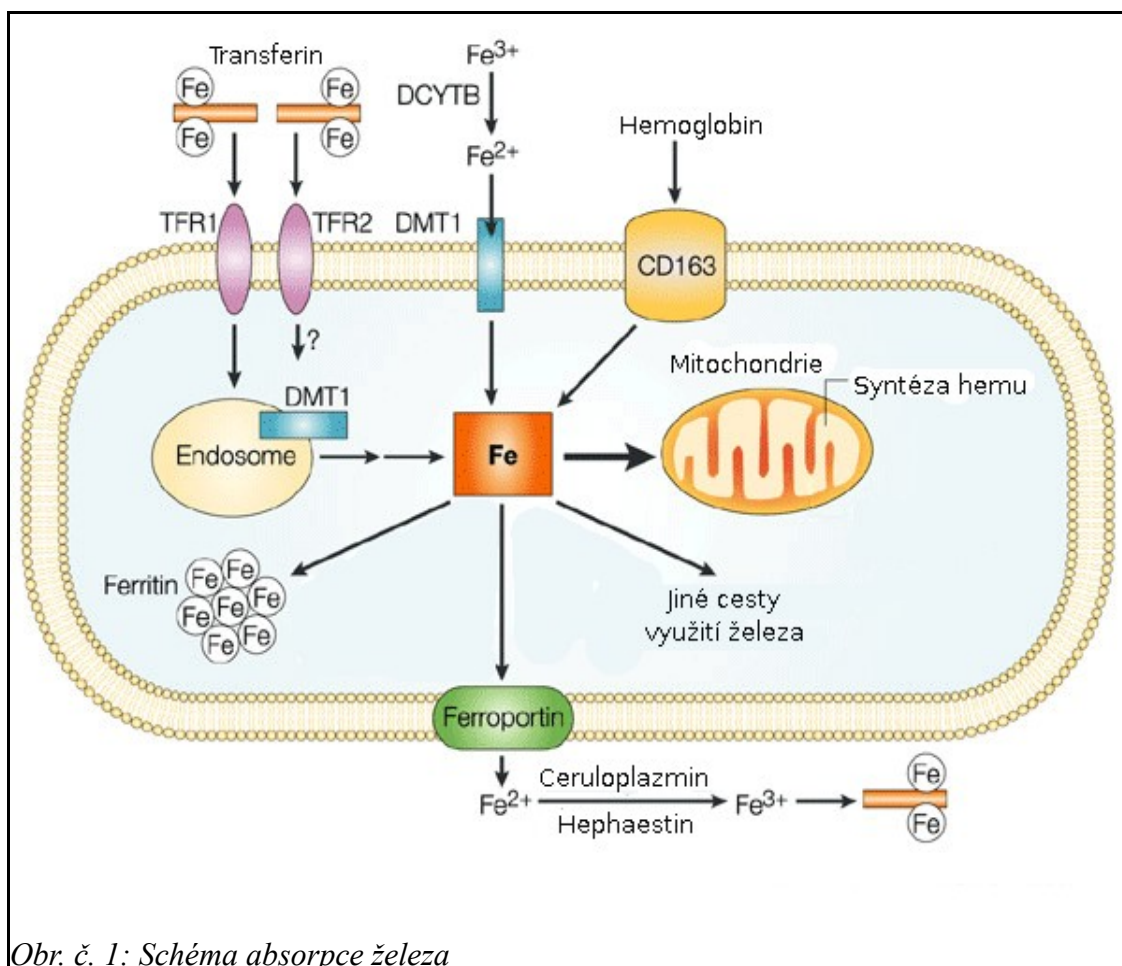
kompetitivním mechanismem snižovat absorpci železa v potravě (PICARD ET AL, 2000). Pomocí DMT 1 transportéru železo vstoupí do enterocyty, kde musí dosáhnout jeho druhého pólu, na němž může přestoupit do krve. Vystupuje přitom jediný známý exportér železa z buňky – **ferroportin**. Jeho aktivita je pod kontrolou hepcidinu, hormonu pocházejícího z jater (FRAZER DM, 2005). Vyskytuje se převážně v enterocytech duodena, ve slezinných makrofázích a v Kupfferových buňkách jater, kde se jeho exprese zvyšuje jako odpověď na erytropoézu z nedostatku železa. Z toho plyne, že střevní epiteliální buňky a retikuloendoteliální makrofágy jsou vzájemně zapojeny do vstřebávání železa ze stravy a do jeho recyklace z hemu ze stárnoucích erytrocytů, což jsou dva kritické procesy v homeostáze železa. Zajímavé ale je, že jeho druhy zachycené v těchto buňkách mají odlišnou pohyblivost v SDS-PAGE. Tyto rozdíly v pohyblivosti při elektroforéze jsou zapříčiněny rozdílnými postranslačními glykosylacemi N-vázaného komplexu molekul. Další odlišností je jeho umístění v těchto buňkách. V enterocytech je umístěn v bazolaterální membráně a v makrofázích se nachází převážně ve vesikulárním kompartmentu (CANONNE-HERGAUX F. ET AL, 2005).

Při nedostatku železa se buňky krypt přesouvají ke klkům, aby tak zvýšili účinnost přenosu ke vnitřním tkáním. 75% absorbovaného železa je vázáno na proteiny, které hrají roli v transportu kyslíku např. hemoglobin nebo myoglobin, 10 – 20% se ukládá do zásoby a může být použito pro tvorbu erytrocytu (LITWACK G, 2008).

Železo, které z enterocyty nevystoupí do krve, se po několika dnech ztrácí společně s buňkami, které se pravidelně ze střevní sliznice odlupují a jsou nahrazovány novými (VOKURKA M, 2006).

2,5 g ze vstřebeného železa je včleněno do hemoglobinu a dalších 5 mg je určeno k jiným potřebám. Několik desetin gramů je vázáno na myoglobin a zhruba 0,02 g je distribuováno v početných proteinech sloužících k elektronovým transportům např. jako v

dýchacím řetězci, který generuje většinu tělních zásob ATP. Asi 1 g je skladován ve feritinu pro budoucí použití (LITWACK G, 2008).



Obr. č. 1: Schéma absorpce železa

2.4.1. Ovlivnění absorpce železa

Těhotenství

Během těhotenství pozorujeme snížené zásoby železa a saturaci transferinu a zároveň zvýšenou expresi TFR 1 v játrech což naznačuje, že během těhotenství dochází k postupnému snižování zásob železa.

Proto se musí jeho absorpce v těhotenství zvýšit, aby se uspokojily zvýšené požadavky na železo pro rostoucí plod. Duodenální exprese železo – transportujících molekul DMT1, DCYTB a Ireg 1 se zvyšuje a zároveň dochází ke snížení exprese hepcidinu, HFE a TFR2 v játrech. Tím si organizmus těhotných žen obstarává zvýšenou absorpci železa. Expresi všech molekul se vrací do normálních hodnot během 24 – 48 hodin po porodu (MILLARD NK ET AL, 2004).

Novorozenci

Střevní absorpce u novorozenců je extrémně vysoká a významně klesá až po skončení kojení, v tomto období dochází totiž ke zvýšené expresi transportérů železa. Po odkojení se exprese a tím pádem i transport železa z potravy dostává na normální hodnoty (FRAZER DM ET AL, 2007).

Zinek v potravě u dětí

Účinky zinku jsou závislé na věku. Zinek ve stravě u dětí, které ještě nemají plně vyvinutý DMT1 a ferroportin v apikální a bazolaterální membráně, má negativní účinky na střevní absorpci železa. Dochází k jeho zadržování střevem a ke snížení hladin hepcastinu. Počas pozdního dětství, kdy už jsou DMT 1 a FPN správně umístěné v apikální a bazolaterální membráně, negativní účinky zinku nejsou znatelné (KELLEHER SL. ET AL, 2006).

Pohyb

Pravidelné cvičení zlepšuje stav železa v organizmu zvýšením duodenální exprese transportéru DMT 1 a ferroportinu 1 (LIU YQ. ET AL, 2006).

Terapie erythropoetinem

Erythropoetin je hlavním regulátorem produkce červených krvinek a stimuluje proliferaci a diferenciaci progenitorových buněk červené řady. Po podání rekombinantního lidského EPO je výrazně stimulována erythropoéza a s ní i dramatické snížení exprese mRNA jaterního hepcidinu. Proto je terapie erythropoetinem spojená se zvýšenou střevní absorpcí železa (KONG WN. ET AL, 2008).

2.5. Metabolismus železa

Po vstřebání z duodena má železo dvě možné cesty:

a) vazba na transferin

Při výstupu z enterocyту ferroportinem se železo musí s ohledem na vazbu na transferin oxidovat na trojmocnou formu. Oxidaci zajišťuje hephaestin – protein, který je zabudován v membráně enterocyту. Poté se trojmocná forma váže na transportní protein transferin (VOKURKA M, 2006).

Transferin patří do skupiny proteinů akutní fáze (VOKURKA M,

HUGO J ET AL, 2005). Je to nosný protein, který reguluje transport železa z místa absorpce do všech tkání těla (LITWACK, 2008). Je tvořen jedním řetězcem, který má dvě vazebná místa pro železo (VOKURKA M, HUGO J ET AL, 2005). Obvykle je transferin z 20 – 45 % saturován železem. V krvi kolující transferin směřuje k buňkám, které na své membráně mají pro transferin receptor tzv. transferinový receptor. Čím více železa buňka potřebuje, tím více má na svém povrchu těchto receptorů; velký počet mají vyvíjející červené krvinky v kostní dřeni. Transferin navázaný na receptor je pohlcen endocytózou do malých dutinek v buňce ohraničených buněčnou membránou (endosomů), kde se železo díky sníženému pH uvolní z transferinu a projde přes membránu pomocí DMT1 transportéru, obdobně jako je tomu ve střevě, do vnitřku buňky. Následně proběhne recyklace transferinového receptoru na povrch buňky a transferinu do krve (VOKURKA M, 2006).

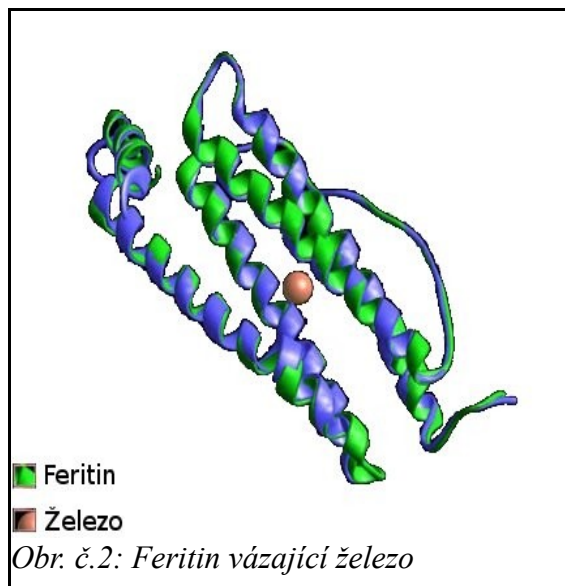
transferinové receptory zabudované v membráně buněk dělíme na dva typy:

1) transferinový receptor 1 je přítomen na většině buněk a jeho exprese je regulována množstvím a potřebou železa. Jeho afinita k transferinu se snižuje hemochromatozním proteinem.

2) transferinový receptor 2 je ve velké míře přítomen na jaterních a erytroidních buňkách. Jeho exprese není regulována železem a jeho afinita k transferinu je nižší, než jak je tomu u TFR1 (VOKURKA M, HUGO J ET AL, 2005).

b) uložení do zásobní bílkoviny feritinu

Feritin je heteropolymer složený z 24 podjednotek H a L řetězců. Těžký řetězec je důležitý pro oxidaci železa (VOKURKA M, HUGO J ET AL, 2005). Jedna molekula feritinu může uskladnit až 4000 atomů železa v jeho minerálním jádře. Jeho produkce je přímo úměrná obsahu železa v potravě



(LITWACK G, 2008). Při velkém nadbytku železa v buňkách může vznikat z feritinu pigment hemosiderin, z něhož na rozdíl od feritinu není železo mobilizovatelné v případě potřeby (VOKURKA M, 2006)

Metabolismus železa a mědi spolu úzce souvisí, protože se vzájemně mezi sebou ovlivňují. Pro metabolismus obou prvků jsou důležité proteiny hephaestin a ceruloplazmin. Jak bylo totiž prokázáno měď je nezbytná pro správné fungování a stabilitu těchto proteinů tzn. že nedostatek mědi vede ke sníženým hladinám železa v některých tkáních, zatímco v játrech a ve střevě vede k jeho přebytku (CHEN H. ET AL, 2006).

Zánětlivé cytokiny IL-6, IL-1 a TNF α , které doprovázejí odpověď akutní fáze (APR), mají vliv na změnu exprese molekul, které se starají o metabolismus a regulaci železa. Zvýšené exprese jsou u transferinu, transferinového receptoru 1 a 2, feritinu, dvujmocného transportéru železa a IRP 1 a 2, naopak snížené u hemojuvelinu, ferroportinu, DCYTB

a hephaestinu. Tímto mechanismem cytokiny akutní fáze upravují genovou expresi důležitých proteinů koloběhu železa (SHEIKH N. ET AL, 2007).

2.6. Recyklace železa

Velká část železa se uvolňuje ze stárnoucích erytrocytů, které jsou odstraněny z krve pohlcením makrofágy. Tento děj probíhá především ve slezině. Železo se v makrofázích uvolňuje z hemoglobinu a může v nich být uskladněno nebo vystoupit pomocí ferroportinu do krve, kde se rovněž naváže na transferin. Jeho oxidaci zajišťuje plazmatický protein ceruloplasmin, který je analogem hephaestinu.

Při intravaskulární hemolýze, kdy se erytrocyty rozpadají a do cirkulace se tak dostává hemoglobin je důležitý haptoglobin. Je to protein akutní fáze, který volný hemoglobin z plazmy vyvazuje. Jeho další funkcí je účast na regulaci exprese ferroportinu ovládním sérových hladin hemoglobinu a tím přispívá k regulaci přenosu železa z duodenální mukózy do séra. Při absenci tohoto proteinu tzv. anhaptoglobulinémii je změněná distribuce hemového železa. Dochází ke zvýšenému exportu železa z membrány duodena do séra v závislosti na zvýšené duodenální expresi ferroportinu jak na úrovni proteinu tak na úrovni mRNA, ale exprese jaterního hepcidinu se nemění (MARRO S ET AL, 2007).

2.7. Osud železa v buňkách

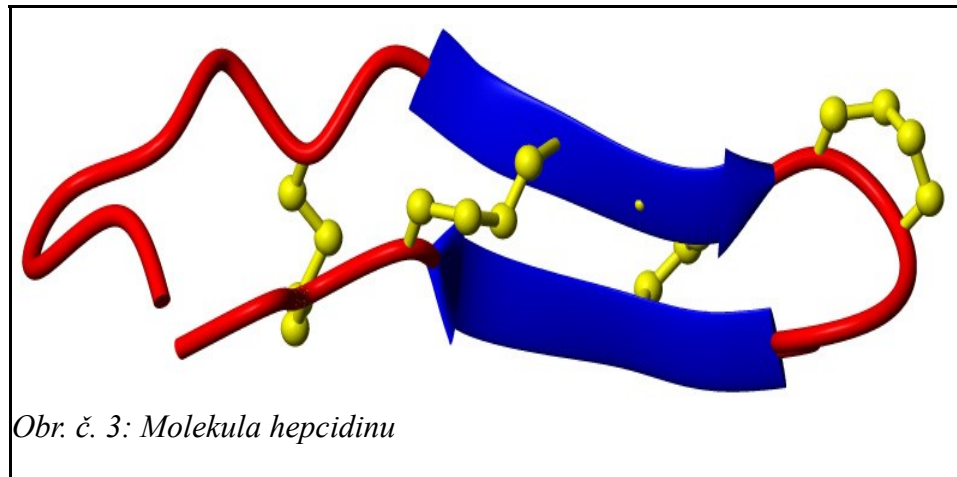
V buňkách pak může být železo zabudováno do hemu v mitochondriích za účasti enzymu ferrochelatázy, která katalyzuje začlenění železa do protoporphyrinu IX za vzniku hemu (VOKURKA M, 2006).

2.8. Regulační systémy metabolismu železa

Regulace metabolismu železa je důležitá jak s ohledem na jeho zásadní význam a jeho toxicitu. Jelikož není znám žádný mechanismus, kterým by se organismus mohl železa zbavovat, musí být regulace na úrovni resorpce a distribuce železa. V regulaci metabolismu železa na úrovni organismu má klíčovou roli peptid hepcidin a další molekuly, které ovlivňují jeho expresi; patří k nim zejm. HFE, hemojuvelin a transferinový receptor 2. Vyskytují se především v játrech, která jsou i místem tvorby hepcidinu a která jsou tak orgánem z hlediska železa nejen zásobním, ale i regulačním. Kromě jater je pro recyklaci železa důležitá také kostní dřev a makrofágový systém.

Z hlediska buněk má pro regulaci železa význam intenzita tvorby proteinů, které železo do buněk přenášejí např. transferinový receptor, nebo ho naopak skladují jako je feritin, nebo ho využívají jak je tomu např. ve vyzářujících červených krvinkách zejm. erytroidní forma syntázy kyseliny delta-aminolevulové. Míra syntézy těchto proteinů je regulována na úrovni stability jejich mRNA pomocí tzv. IRE/IRP (iron-responsive elements, resp. proteins). Díky nim se při nedostatku železa stabilizují mRNA pro transferinový receptor, přinášející železo do buněk, a naopak degradují mRNA pro proteiny skladovací (feritin) a využívající železo (eALAS). V případě nadbytku železa je tomu právě naopak (VOKURKA M, 2006).

2.8.1. Heparin



Nejdůležitějším regulátorem metabolismu železa je hepcidin, bioaktivní peptid složený z 25 aminokyselin (KULAKSIZ H. ET AL, 2008). Má 8 cysteinů, které tvoří 4 cystinové můstky, z čehož vyplývá jeho zvláštní, vlásenkovitá struktura (VOKURKA M, 2006). Vzniká v hepatocytech a v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu z prekursoru prohepcidinu. Vylučuje se při zánětlivých procesech a při zvýšené hladině železa v organismu (KULAKSIZ H ET AL, 2008). Patří do skupiny kationických peptidů β -defensinů, plnících úlohu v antimikrobiální obraně. Odtud právě vznikl jeho název: *hepatic bactericidal protein* (VOKURKA M, HUGO J ET AL, 2005). Jeho ochrana organismu před mikroby spočívá v tom, že snižuje extracelulární koncentraci železa a tím snižuje jeho dostupnost pro mikroorganismy (GANZ T, 2006). Zároveň je však snížena jeho dostupnost pro krvetvorbu, což spolu s ostatními zánětlivými cytokiny přispívá k anemii tzv. anemii chronických chorob, ACD (VOKURKA M, 2006). Byl objeven teprve v roce 2000 nejprve u myši a později také u lidí. Díky jeho malé molekule a podobnému složení mezi jednotlivými druhy je jen málo antigenní (VOKURKA M, HUGO J, ET AL, 2005).

Příbuzné typy hepcidinu byly identifikovány u některých druhů ryb a předpokládá se že mají účinek endogenních antibiotik, které zabezpečují obranu organismu před infekcí. Můhou tedy posloužit k léčebným účelům.

Hypoxie má vliv na hladiny exprese hepcidinu, protože vzrůstají nároky na erytropoézu. Konkrétně dochází ke snížení exprese hepcidinové mRNA. Pochody kterými se snižuje exprese hepcidinu jsou neznámé, ale předpokládá se přímé působení hypoxie na hepatocyty. Organismus se s hypoxií vyrovnává ještě zlepšením přenosu železa z duodenálního lumen do krve jeho sníženým ukládáním do sliznic, ale tento proces není schopen pokrývat požadavky na zvýšenou erytropoézu (LEUNG PS ET AL, 2005).

Alkoholová zátěž podobně jako hypoxie snižuje expresi hepcidinu. Bylo prokázáno, že sérová koncentrace prohepcidinu je u pacientů s ALD významně zvýšena s porovnáním se zdravou populací. Nevyskytuje se ale úplná absence prohepcidinu v cytoplasmě hepatocytů, tvoří se zcela fyziologicky, ale až po alkoholové zátěži dochází k jeho snížené expresi. Je tudíž běžné, že pacienti závislí na alkoholu mají přebytek železa v játrech, což může vést k tzv. alkoholové nemoci jater (OHTAKE T ET AL, 2007).

Funkce hepcidinu

Hepcidin snižuje resorpci železa ve střevě, čímž zabraňuje nadbytku železa v organismu. Naopak při nedostatku železa množství hepcidinu klesá. Kromě střevních buněk způsobuje zadržení železa v makrofágovém systému. Oba účinky vedou k poklesu koncentrace železa v plazmě a dlouhodobě k nedostatku železa (VOKURKA M, 2006). Exprese hepcidinu v játrech souvisí s expresí DMT1, duodenálního cytochromu B, hephaestinu a IREG1 v duodenu. V případě zvýšené exprese hepcidinu se exprese těchto železo –

transportujících molekul snižuje a naopak (ANDERSON GJ ET AL, 2002). Také bylo prokázáno, že exprese těchto molekul není ovlivňována jen zásobami železa, erythropoézou a saturací transferinu, ale i změnou stravy na železo deficitní. Tento stav je doprovázen zvýšením duodenální exprese DCYTB, DMT1 a IREG1 a snížením jaterní exprese hepcidinu (FRAZER DM. ET AL, 2002).

Mechanismus účinku hepcidinu spočívá ve vazbě na ferroportin, který je následně buňkou pohlcen a degradován. Buňky tak železo nemohou ze sebe uvolnit a železo se v nich hromadí (VOKURKA M, 2006). V enterocytech blokuje apikální příjem inhibicí transkripce DMT1 (MENA NP, ET AL, 2007). Pokud jde o střevní buňky, které ho již z potravy vstřebaly, nepředají železo do krve a po jejich zániku s ním železo odchází do stolice. V případě makrofágů, které železo recyklují ze starých červených krvinek, železo v organizmu zůstává, ale nemůže být použito pro krvetvorbu. Nedostatečná tvorba hepcidinu je popsána u většiny forem hereditární hemochromatózy, onemocnění, při němž dochází v organizmu k nadbytku železa (VOKURKA M, 2006). Při zvýšení nároků organizmu na železo úroveň hladiny hepcidinu klesá a více železa vstupuje do plazmy. Předpokládá se že signál, který způsobí změnu exprese hepcidinu je hladina cirkulujícího transferinu, která odráží hladiny tkáňového železa. Další molekuly, které mohou být zapojeny do zprostředkování tohoto signálu jsou HFE protein, TFR2 a hemojuvelin (STEELE TM. ET AL, 2005).

HFE protein je v játrech potřebný k přiměřené expresi hepcidinu, stává se tak důležitým regulátorem tělních zásob železa. Je také přítomen ve střevě, ale tam jeho úloha není dosud úplně známa, předpokládá se že má sekundární roli v absorpci železa nezávisle na hepcidinu (WEST AR ET AL, 2005). Duodenální a jaterní hladiny HFE jsou regulovány rozličnými působky, které zatím ale nebyly zcela objasněny. Bylo prokázáno, že náhrada železa ve stravě způsobila snížení duodenálního HFE ale ne jaterního. Z toho vyplývá, že na expresi duodenálního HFE má vliv složení stravy. HFE kromě exprese hepcidinu ovlivňuje interakci železa vázaného na transferin

s transferinovými receptory tzn. příjem železa do buněk (LUDWICZEK S. ET AL, 2004).

Hemojuvelin je na membránu vázaný rozpustný protein, který je zodpovědný za stav přetížení železem. Hraje důležitou roli v metabolismu železa, protože pozitivně reguluje hepcidin. Je kódován HFE genem a vysoce exprimován v kosterním svalu, srdci a v menším množství také v játrech (PAPANIKOLAOU G, 2004). Hemojuvelin je koreceptorem kostního morphogenetického proteinu (BMP), který také pozitivně reguluje expresi hepcidinu v jaterních buňkách (BABITT JL ET AL, 2007).

Transkripce hepcidinu je zvýšena :

- prozánětlivým cytokinem IL-6
- při nadbytku železa v organismu
- je-li transferin nasycen železem
- při snížené potřebě erytropoézy (JACOLOT S, ET AL, 2008)

2.9. Poruchy metabolismu železa

2.9.1. Nadbytek železa

Nadbytek železa je škodlivý stav, protože se ukládá v některých orgánech a poškozuje je. Dochází k poškození jater, slinivky břišní, srdce, kloubů, žláz s vnitřní sekrecí s různými projevy aj. Typické je někdy bronzové zbarvení kůže, proto se v kombinaci s cukrovkou někdy hovoří o bronzovém diabetu (VOKURKA M, 2006). Onemocnění je obtížné diagnostikovat. Jako léčba se indikují krevní odběry (LITWACK G, 2008) a dále se s rozvojem farmakologie začla používat

léčba cheláty. Cheláty jsou látky vyvazující železo do komplexů, které jsou pak vyloučeny z organismu (PUNNONEN ET AL, 1997).

S ohledem na roli hepcidinu jako hormonu regulující železo, úpravy jeho aktivity za použití agonistů a antagonistů se jeví jako nový možný směr v léčbě (PIETRANGELO A ET AL, 2004). Bez léčení může hemochromatóza vést k neplodnosti, arytmií, diabetu a selhání jater (LITWACK G, 2008).

Vrozené poruchy:

Hereditární hemochromatóza (HH) zahrnuje několik dědičných poruch homeostázy železa charakterizovaných jeho zvýšené gastroenterální absorpce a ukládáním do tkání (FLEMING RE. ET AL, 2005). Je pravděpodobné, že nepřiměřené hladiny cirkulujícího hepcidinu vedou k nekontrolovávanému uvolňování železa ze střeva a makrofágů (PIETRANGELO A ET AL, 2004).

1. typ hereditární hemochromatózy je HFE vázaná, skoro vždy zapříčiněná homozygotní mutací C282Y (FLEMING RE. ET AL, 2005). Způsobuje nekontrolovatelnou aktivitu transferinového receptoru (Litwack G, 2008). U značné části C282Y homozygotů se nevyvine klinicky zřejmý přebytek železa, což naznačuje podíl faktorů prostředí a upravujících genů ve výsledném fenotypu (FLEMING RE. ET AL, 2005). Absence HFE proteinu způsobuje sníženou tvorbu hepcidinu a hladinu jaterního TFR2 a zvýšení exprese duodenálního DCYTB, DMT1, TFR a IRP, ale exprese ledvinného DCYTB a DMT1 jsou naopak sniženy. Tento stav v organismu naznačuje nedostatek železa, tím pádem se jeho absorpce zvyšuje a dochází k přetížení. Tato změna může být spojena s neadekvátním rozpoznáním železa játry na základě snížené exprese TFR2, což způsobuje snížené hladiny cirkulujícího hepcidinu. Navíc reabsorpce železa ledvinami může být změněna a to ještě více prohlubuje přetížení železem. Z toho plyne, že u tohoto typu hemochromatózy je porušena zpětnovazebná regulace duodenální

absorpce železa hepcidinem (LUDWICZEK S ET AL, 2005).

2.typ hereditární hemochromatozy je těžce probíhající juvenilní forma, u které může být buď mutace v hemojuvelinu - typ 2A nebo vzácněji v hepcidinu - typ 2B (VOKURKA M, HUGO J. ET AL, 2005). Typ 2 A, tedy mutace hemojuvelinu způsobuje závažnou hemochromatózu s časným začátkem. Typickým znakem je zvýšená hladina sérového železa. Převládá jeho ukládání v játrech, pankreatu a srdci, ale v tkáňových makrofázích jsou jeho hladiny sniženy. Pacienti trpící juvenilní formou hemochromatózy mají zvýšenou expresi ferroportinu jak ve střevních epitelálních buňkách tak v makrofázích a snížené hladiny hepcidinu v moči (HUANG FW. ET AL, 2005). U typu 2B se vyskytují vyšší hladiny transkriptů genů zapojených do střevní absorpce železa DCYTB, DMT 1 a ferroportin (WANG RH. ET AL, 2005).

3.typ hereditární hemochromatozy je způsoben mutací transferinového receptoru 2. Je zde zvýšená absorpce železa z důvodu zvýšení exprese genů, které se podílejí na jeho absorpci (DMT1, Dcytb) a transportu (transferin). Téměř všechno absorbované železo je rychle přijato játry, ale i navzdory vysoké hladině jaterního železa je exprese hepcidinu snížena (DRAKE SF. ET AL, 2006).

4.typ hereditární hemochromatozy se vyskytuje autozomálně dominantní mutace ferroportinu (VOKURKA M, HUGO J. ET AL, 2005).

U vrozeného deficitu β 2mikroglobulinu se také vyskytuje přetížení organismu železem a toto onemocnění se podobá na HH. Deficit v této molekule má za následek zvýšenou expresi DMT1 a ferroportinu 1. Z toho vyplývá, že i β 2 mikroglobulin se může významně podílet na homeostáze železa, což jen dále zdůrazňuje vztah metabolismu železa a imunitního systému (MUCKENTHALER MU. ET AL, 2004)

Získané poruchy:

Sekundární přetížení železem je častý klinický stav nacházející se ve spojení s vícenásobnými transfuzemi krve. Na začátku se akumuluje ve slezinných makrofázích a dochází ke zvýšení exprese ferroportinu a feritinu a následkem toho se snižuje jeho obsah ve slezině. Později se železo začíná ukládat v hepatocytech a souběžně se zvyšují hladiny hepcidinu a hemojuvelinu. Za těchto podmínek se železo stále absorbuje z duodena, protože exprese DMT1 zůstává stále vysoká, ale jeho transport do cirkulace se snižuje a včleňuje se do duodenálního feritinu (THEURL I ET AL, 2005).

K získanému nadbytku železa také mohou vést např. některé anemie ze zvýšeného rozpadu červených krvinek tzv. hemolytické anemie a stavy, kdy železo, které se takto dostane do těla, nemůže být dále využito např. u stavů s útlumem kostní dřeně, talasemií, myelodysplastickým syndromem (VOKURKA M, 2006).

2.9.2. Nedostatek železa

Nedostatek železa způsobuje tzv. sideropénické anémie (PECKA M, 2006). Jeho nedostatek v organismu může být zapříčiněn:

- nedostatečný příjem potravinou
- porušená resorpce železa při onemocnění žaludku (LITWACK G, 2008)
- příjem železa nestačí krýt zvýšené nároky na jeho potřebu např. dospívání, těhotenství, některé infekční choroby (PECKA M, 2006)
- krevní ztráty zapříčiněné např. úrazem, těžkou menstruací nebo vnitřním krvácením z vředů

- tumory převážně tlustého střeva
- Užívání léků jako např. aspirinu a nesteroidních antiflogistik, které mohou vyvolat vnitřní krvácení, zejména ze vředu (LITWACK G, 2008)

Následek sideropénických anémií je snížení syntézy hemoglobinu a enzymatických systémů obsahujících železo (PECKA M, 2006). Má ale i ekonomické následky, protože postižení jedinci mají sníženou pracovní schopnost a u dětí oslabuje růst a učení (LITWACK G, 2008).

Rozeznáváme 3 stádia vývoje:

- Prelatentní deficit, kde zatím dochází jen k postupnému snižování zásob železa, ale jeho přísun do erytroblastu není ovlivněn.
- Latentní deficit, kde už jsou zásoby vyčerpány a dochází ke snížení plazmatického železa (PECKA M, 2006). U tohoto deficitu nemusí být symptomy pozorovatelné (LITWACK G, 2008).
- Anémie, kde jsou zásoby a plazmatické železo zcela vyčerpány a pozorujeme sníženou hladinu hemoglobinu a rozvoj klinických příznaků (PECKA M, 2006): bledou barvu kůže, únavu, dušnost, křeče v nohou, palpitace při chůzi do schodů, podrážděnost, závratě, slabost, bolest jazyka, atrofie chuťových poharků, léze v koutcích úst, lámavé nehty, frontální bolest hlavy, poruchy spánku, snížená chuť k jídlu. Pokročilá stádia anémií z nedostatku železa mohou vést k problémům s polykáním. U některých lidí s nedostatkem železa se může vyskytnout stav známý jako PICA což je behaviorální porucha, nebo-li porucha chování. Nemocní trpící tímto stavem jedí věci jako např. bláto a škrob atd.

Anémie je jednoduše diagnostikována zjišťováním krevních hladin hemoglobinu. Nápomocné jsou také hladiny hematokritu, což je objem erytrocytů vztažený na celkový objem krve. Jiné diagnostické hodnoty jsou velikost erytrocytů, sérové hladiny železa a vazebná kapacita

železa.

Orální podání Fe^{2+} jako sulfátu je běžně používáno a většinou upraví deficit. Hladiny krevního hemoglobinu jsou kontrolovány pro potvrzení zlepšení stavu. U závažných klinických stavů, kde perorální železo nemůže být absorbováno nebo v průběhu akutního krvácení může být podána intravenózní transfuze. V případě že se prokáže, že zdrojem krvácení je rakovina tlustého střeva je indikováno odstranění nádoru operativně (LITWACK G, 2008).

3. Metody ke stanovení železa

Všechny analytické postupy chemické analýzy jsou založeny na měření vhodné fyzikální veličiny, která představuje tzv. analytický signál, který je funkcí obsahu sledované složky neboli analytu. Podle povahy analytického signálu rozlišujeme jednotlivé druhy analytických metod. V souladu s tímto principem se pod optickými metodami rozumí takové postupy, při kterých dochází k jistým změnám při průchodu záření transparentním prostředím a při interakci atomů s elektromagnetickým zářením (STUŽKA V, 2000). Podstatou spektrometrických metod je sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou s cílem využít pozorovaných jevů pro důkaz látky, studium její struktury nebo stanovení její koncentrace. Porovnáním všech spektrometrických metod zjistíme, že interakce je možno rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinou tvoří interakce při nichž dochází k výměně energie mezi zkoumanou látkou a zářením. V druhém případě látka pouze určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření, aniž by docházelo k výměně energie.

Interakce, při nichž hmota a záření vyměňují energii

Tyto interakce jsou založeny na skutečnosti, že atomy a molekuly mohou měnit svůj energetický stav přijetím nebo vyzářením energie. Metody založené na tomto principu jsou: atomová absorpční nebo emisní spektrometrie.

Interakce, při nichž nedochází k výměně energie mezi hmotou a zářením

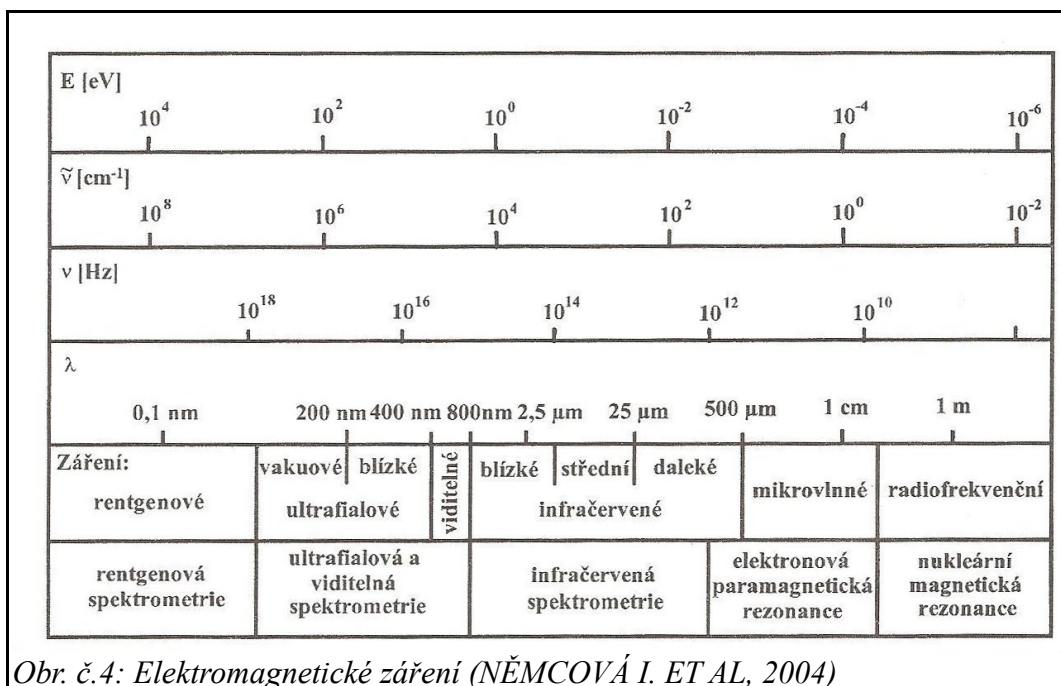
Do této skupiny patří metody, ve kterých při průchodu záření vzorkem je ovlivňována jeho rychlost a směr průniku – metody měření indexu lomu tj. refraktometrie a interferometrie. Stáčení roviny polarizovaného světla – polarimetrie. Rozptýlení záření částicemi zakaleného roztoku – turbidimetrie a nefelometrie.

3.1. Elektromagnetické záření

Souhrn všech vlastností záření je možno vystihnout pouze na základě předpokladu vlnové - korpuskulárního charakteru záření. Podle této teorie má záření vlastnosti vlnové tj. ohýbá se, odráží a láme atd. A také se chová jako proud elementárních kvant energie, fotonů, které se pohybují jako částice. Pohybující se částici je přiřazena určitá vlnová délka, která se dá také vyjádřit vztahem:

$$\lambda = h / m \cdot u;$$

kde h je Planckova konstanta, m je hmotnost částice, u je její rychlost. Každé elektromagnetické vlnění je možno charakterizovat několika základními veličinami. Jsou to: frekvence neboli kmitočet ν , který udává počet kmitů za sekundu. Jednotkou kmitočtu je 1 hertz (Hz), který označuje 1 kmit za sekundu. Vlnová délka λ je dráha, o kterou postoupí vlna za dobu jednoho kmitu. Vlnočet ν je odvozen od vlnové délky a označuje počet vln připadajících na dráhu 1 cm (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).



3.2. Atomová spektra

Optická spektra vznikají přechody vnějších, tzv. valenčních elektronů z výšekvantových na nížekvantové, popř. základní hladiny elektronu v atomu. Ze všech možných přechodů se ve spektru objeví jen „povolené“, dané výběrovými pravidly. S rostoucím počtem valenčních elektronů vzrůstá počet přechodů a také vzájemné ovlivňování elektrických a magnetických polí elektronů a atomového jádra. Proto u prvků seřazených v periodické soustavě vzrůstá složitost spekter zleva doprava. Intenzita čáry je tok záření dané vlnové délky. Nejintenzivnější čáry vznikají přechodem mezi hladinou základní a nejbližší vyššími, z nichž může přejít elektron jednoznačně jenom do hladiny základní. Tyto čáry se nazývají rezonanční a obvykle jsou nejintenzivnějšími čarami ve spektru (STUŽKA V, 2000).

Atomy mohou elektromagnetické záření o určité energii pohlcovat nebo naopak vysílat. Energie atomů v různých stavech jsou určeny

především výskytem elektronů v určitých energetických hladinách. Při absorpci nebo emisi záření dochází k přechodu elektronů mezi energetickými hladinami. Jednotlivé stavy atomů se liší energií podle toho, na kterou hladinu byl elektron excitován. Při přechodu mezi jednotlivými stavy atomu může atom absorbovat nebo emitovat foton, jehož energie je rovna úbytku nebo přírůstku energie atomu ΔE podle Planckova vztahu.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu,$$

kde E_2 , E_1 jsou energie atomu ve vyšším a nižším energetickém stavu, h je Planckova konstanta ν je frekvence vyzářeného nebo absorbovaného záření. K excitaci může dojít buď absorpcí elektromagnetického záření nebo předáním energie elektrickým výbojem, zahřátím na vysokou teplotu apod. Absorpci záření v UV a VIS oblasti odpovídá excitace vnějších elektronů. Při tomto jevu pozorujeme absorpční spektrum. Ve vybuzeném stavu zůstává atom jen krátce, asi 10^{-8} s. energii ztrácí srážkami s jinými částicemi nebo emisí fotonu při fluorescenci.

K popisu elektronu v prostoru je zapotřebí tří souřadnic: n , l a m . Souřadnice l je *hlavní kvantové číslo*, které nabývá hodnot 1, 2, 3 atd (KOMÁREK J, 2000). Energie elektronu v izolovaném jednoelektronovém atomu je určena *hlavním kvantovým číslem* n , neboť platí vztah:

$$E_n = \text{konst.} \cdot z^2/n^2;$$

kde z je *protoné číslo*. Energie elektronu je tedy kvantována (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004). Souřadnice l je *vedlejší kvantové číslo*, které kvantuje úhlový moment hybnosti elektronu na jeho energetické hladině. Stavy s vedlejšími kvantovými čísly $l = 0, 1, 2, 3$ se označují jako stavy s, p, d, f a stejně se označují i elektrony na odpovídajících hladinách. Souřadnice m je *magnetické orbitální kvantové číslo*, které

se vztahuje k orientaci orbitalu. Rotaci elektronu kolem vlastní osy charakterizuje *spinové kvantové číslo* s . Kombinace čtyř kvantových čísel n , l , m a s , kterou se liší od všech ostatních elektronů ve stejném atomu, určuje stav každého elektronu. (KOMÁREK J, 2000).

Instrumentace

Přestože spektrometrické metody jsou po experimentální stránce často odlišné, obsahují všechny typy přístrojů několik základních částí, které jsou pro všechny metody společné (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

3.3. Z historie atomové spektrometrie

Metody atomové spektrometrie jsou založeny na fyzikálním jevu, známém jako Kirchhoffův zákon, podle kterého volné atomy v plynném stavu absorbují záření těch vlnových dělek, které samy vyzařují.

Velkých úspěchů dosáhla spektrální analýza brzy po jejím objevu, když se zjistilo, že každý chemický prvek je charakterizován spektrem, podobně jako člověka charakterizuje otisk prstu.

Počátek dějin spektrální analýzy je připisován Isaaku Newtonovi. Uskutečnil známý pokus s hranolem, který postavil do cesty slunečním paprskům. Hranol změnil jejich směr a zároveň rozložil polychromatické sluneční záření na různobarevné pruhy, začínající červeným a končící fialovým. Newton při svých pokusech rovněž zjistil, že vložením spojitě čočky mezi hranol a štěrbinu lze dosáhnout lepšího rozdělení jednotlivých spektrálních barev. Při prvních pokusech používal štěrbinu s kruhovým výřezem, pak trojúhelníkovou a nakonec štěrbinu s obdélníkovou, které se používá dodnes. Newton určil i sedm barev ve spektru: červenou, oranžovou, žlutou, zelenou, modrou, indigovou a fialovou.

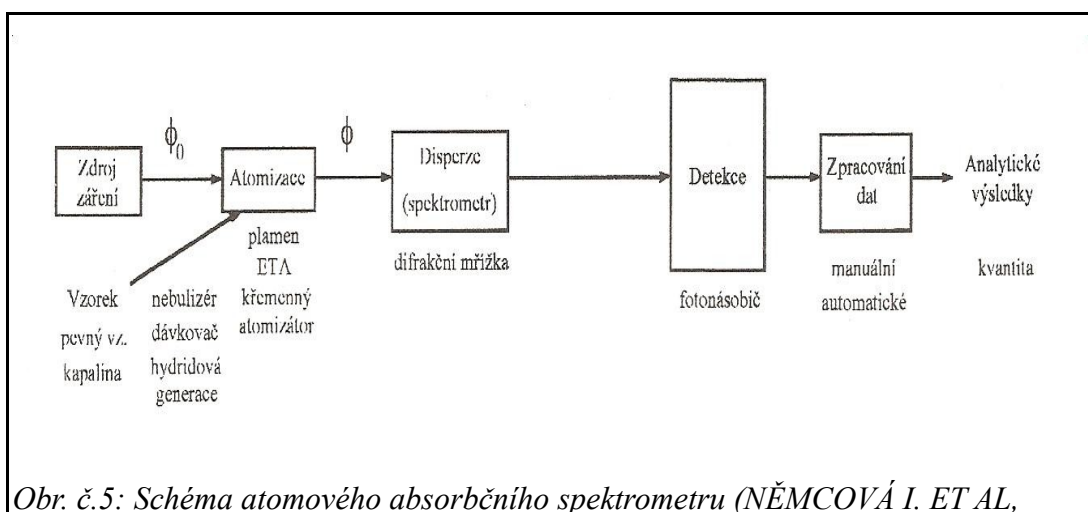
U kolébky spektrální analýzy stál rovněž Jan Marek Marci z Kronlandu pocházející z Čech, který žil v 17. století v Praze. Působil na Karlově univerzitě a zabýval se rozptylem světla a zavedl termín disperze světla.

V roce 1800 objevil Herchel infračervené záření a o rok později Ritter ultrafialové záření, které nazval studeným světlem.

V období 1900 – 1920 dochází k vývoji stejnosměrných, střídavých a vysokonapěťových budících zdrojů. Do té doby bylo pro převedení atomů do excitovaného stavu používáno výlučně plamene.

Teoretické základy emisní spektrální analýzy byly položeny v první čtvrtině dvacátého století. Byly známy spektra většiny prvků, sestaveny jejich tabulky a vybrány nejvhodnější čáry pro analytické účely a byla dobře propracována technika fotografování a měření spekter a komerčně začaly být vyráběny přístroje s obecným názvem spektrografy. Na přelomu šedesátých a sedmdesátých let se začínají stále více prosazovat číslicové počítače jako nedílná součást automatických spektrometrů jak pro zpracování výsledků stanovení, tak i pro řízení práce. Spolu s rozvojem mikroprocesové techniky v sedmdesátých letech dochází k velkým změnám ve stavbě mikropočítačů. Počítač začíná být využíván pro řízení celého analytického procesu od vložení vzorku do přístroje až po zpracování výsledků (STUŽKA V, 2000).

3.4. Atomová absorbční spektrometrie



Atomová absorbční spektrofotometrie je jednou z nejrozšířenějších analytických metod (KOMÁREK J, 2000). Jejím principem je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu, při kterých přecházejí z nižšího do vyššího elektronového stavu (KARLÍČEK R. ET AL, 1998). Volné atomy v plynném stavu absorbují fotony určité energie, záření o určité vlnové délce. Energetická hodnota fotonů je charakteristická pro určitý druh atomů a počet absorbovaných fotonů je mírou množství stanovovaných atomů.

Absorpcí záření se zvýší energie molekuly nebo atomu, čímž se dostávají ze svého základního stavu o nejmenší energii E_0 do stavu excitovaného o vyšší energii E_1 . Absorpcí se snižuje intenzita záření, ale jeho vlnová délka se nemění (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997).

3.4.1. Přístrojové zařízení

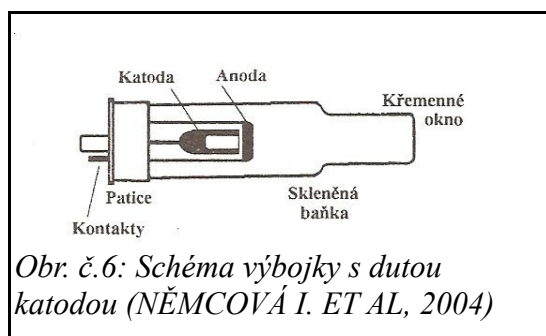
Principem funkce přístroje je: ze zdroje primárního záření vystupuje

záření jednotlivých emisních čar prvku. Prochází absorpčním prostředím, kde volné atomy prvku absorbují určité vlnové délky dopadajícího záření. Monochromátor pak izoluje vybranou čaru. V detekčním systému je detekováno zeslabení toku původního záření, většinou v jednotkách absorbance (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

3.4.1.1. Zdroje primárního záření

V AAS se uplatňují výhradně čárové zdroje záření, to znamená takové, které emitují intenzivní zářivou energii soustředěnou do úzkých spektrálních intervalů, využitelných pro charakteristickou absorpci záření. Zdroje musí být stabilní a s dobrou životností. Velikost vyzářené energie ovlivňuje odstup signálu od šumu a tím i mez detekce, ale neovlivňuje velikost absorbance (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997). Primární záření, které má být atomy sledovaného prvku absorbováno, musí mít vysokou zářivou energii soustředěnou do úzkého spektrálního intervalu (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

Výbojky s dutou katodou



Obr. č.6: Schéma výbojky s dutou katodou (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004)

Výbojky s dutou katodou jsou nejpoužívanějším zdrojem primárního záření. Emitují úzké čary, které nejsou ovlivněny

samoabsorpcí a ve spektru převažují rezonanční čáry. Výbojka s dutou katodou je evakuovaná skleněná baňka, která je naplněná plnicím plynem, většinou neonem nebo argonem na nízký tlak. Výstupní okénko je vyrobeno z materiálu propouštějící příslušné emisní čáry. Pro oblast do 240 nm je to optický křemen, nad 240 nm to může být některý ze speciálních optických druhů skla a pro oblast nad 300 nm stačí již běžné optické sklo. Uvnitř výbojky je instalována dutá katoda, která je vyrobena buď přímo z velmi čistého materiálu prvku, který má být stanovován, nebo je použit tzv. nosič. Nosič je dutý váleček z materiálu s chudým emisním spektrem (hliník, měď). Do vnitřní dutiny nosiče je vložena fólie kovu nebo je na nosič nanesen metodou práškové sintrace příslušný prvek. Technika práškové sintrace se využívá také pro výrobu tzv. víceprvkových lamp, které emitují spektrum několika prvků maximálně ale šesti. Použitelné kombinace prvků jsou však omezeny překryvy emisních čar a tím, že budící podmínky prvků se musí být podobné.

Nad katodou je umístěná anoda z těžkotavitelného materiálu. Na výbojky je zpravidla vkládán potenciálový spád 200 až 600 V a žhavicí proudy od 3 do 25 mA.

Princip funkce výbojky je založen na tvorbě doutnavého výboje v dutině katody. Vložením potenciálu dochází k srážkám elektronů s atomy plnicího plynu, ty jsou ionizovány a jako kladně nabitě ionty jsou přitahovány ke katodě. Zároveň jsou urychlovány v elektrickém poli a při dopadu na dno katody jsou vyráženy volné atomy materiálu do prostoru je to tzv. katodické rozprašování. U snadno těkavých prvků dochází i k termickému vypařování. Volné atomy jsou dále excitovány srážkami s ionty a elektrony a při následné deexcitaci jsou emitovány fotony charakteristické pro materiál katody.

Životnost výbojek je z velké části dána stabilitou tlaku plnicího plynu. Při poklesu tlaku plnicího plynu pod určitou úroveň přestane být výboj stabilní, což se projeví kolísáním intenzity záření.

Bezelektrodové výbojky

Výhodou bezelektrodových výbojek je až o řád vyšší intenzita emitovaného záření při zachování velmi úzké pološířky čar. Vyšší intenzita záření je nutná hlavně v oblasti spektra pod 220 nm, kde se výrazně projevuje absorpce záření vzduchem, atomizačním prostředím a komponenty přístroje. V poslední době se prosadily radiofrekvenčně buzené výbojky, které není nutné termicky stabilizovat.

Vlastní výbojka je křemenná banička válcovitého tvaru. Uvnitř baničky je určité množství směsi čistého prvku a jeho těkavé sloučeniny. Banička je také naplněná plnicím plynem na tlak 30 až 300 Pa a je umístěna do pole cívky generátoru. Uvnitř výbojky dochází k vytvoření stabilního prstencového výboje při stěnách, takže záření prochází zanedbatelnou vrstvou atomové páry uvnitř výbojky a samoabsorbce rezonančních čar je minimální (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997).

Laditelný barvivový laser

Laser je ideálním zdrojem primárního záření pro vlnové délky nad 300 nm. Jeho záření je vysoce monochromatické, dokonale koherentní a dosahuje vysoké hustoty zářivého toku (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

3.4.1.2. Optický systém

Úkolem optického systému je vést paprsek záření ze zdroje skrz absorpční prostředí do disperzního prvku, který izoluje příslušný spektrální interval, a po výstupu z disperzního prvku fokusovat záření na detektor.

Optické systémy obsahují čočky, zrcadla, rotační zrcadlové sektory a polopropustná zrcadla. Čím více je jich v systému, tím větší jsou ztráty záření, které způsobují snížení detekčních limitů. Z toho důvodu se minimalizuje jejich počet ve spektrometrech.

Jako disperzní prvky se v AAS používají výhradně monochromátory, které slouží k izolaci příslušné emisní čáry ze spektra čárového zdroje (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997).

3.4.1.3. Atomizátor

V atomizátoru dochází k absorpci primárního záření vzorkem. Je to systém, který je schopen dostatečně účinně převést stanovované prvky z roztoku vzorku do plynného atomárního stavu (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004). Atomizátor má tedy funkci zdroje a rezervoáru volných atomů a zároveň slouží jako absorpční prostředí (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997). Atomizaci je možné provádět v plameni, elektrotermicky nebo v křemenných atomizátorech.

3.4.1.4. Monochromátor

Jako monochromátoru, sloužící k izolaci spektrálního intervalu, ve kterém se nachází příslušná absorpční rezonanční čára sledovaného prvku, se většinou užívá interferometricky zhotovených mřížek pro rozsah vlnových délek 190 – 900 nm (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

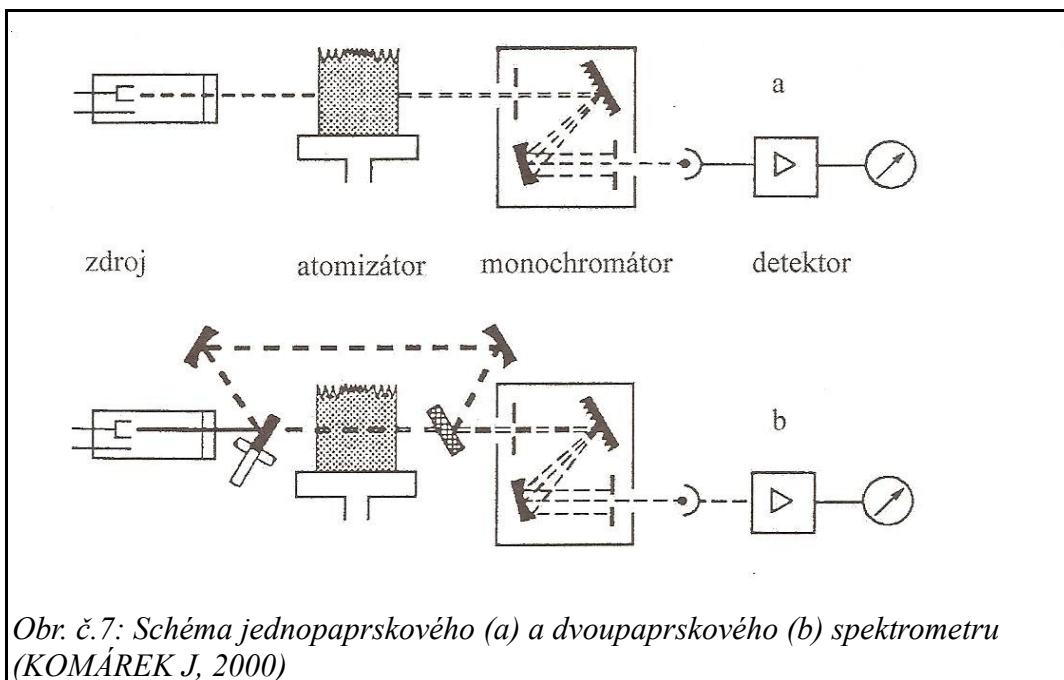
3.4.1.5. Detektor

Pro detekci se především využívá fotonásobič, evakuovaná skleněná baňka se vstupním okénkem z vhodného materiálu, zpravidla z křemene. Uvnitř je fotocitlivá katoda, anoda a systém dynod, kterých

bývá 9 až 13. Celý fotonásobič musí být uzavřen ve světlotěsném pouzdru a bývá umístěn hned za výstupní štěrbinou monochromátoru. Principem činnosti spočívá v tom, že dopadem fotonu na světlocitlivou vrstvu dojde k vyražení elektronu, který je urychlen v elektrickém poli a přitažen na první z dynod. Dopad elektronu na dynodu způsobí vyražení několika sekundárních elektronů, které jsou přitahovány k další dynodě, protože mezi jednotlivými dynodami je udržován potenciálový spád. Tím je zaručen lanovinový vzrůst počtu elektronů a měřitelné výstupní proudy i při nízkých intenzitách dopadajícího záření.

Použitelnost fotonásobiče pro příslušnou spektrální oblast omezuje materiál fotokatody. Dopadající foton musí mít totiž dostatečnou energii pro vyražení elektronu, což vylučuje použití některých fotonásobičů v dlouhovlnné oblasti spektra.

Atomové spektrometry bývají konstruovány buď jako jednopaprskové, nebo dvoupaprskové. Jednopaprskové přístroje jsou jednoduché a vykazují minimální ztráty záření, takže není nutné používat primární zdroje s vyšší intenzitou a detekční limity bývají příznivější. Ale nedokáží eliminovat kolísání intenzity zdroje primárního záření a celkovou nestabilitu systému. U dvoupaprskového přístroje dopadá paprsek z primárního zdroje nejprve na polopropustné zrcadlo, kde dochází k rozdělení na měrný a srovnávací paprsek, z nichž pouze měrný prochází atomizátorem. Potom jsou oba fázově posunuté paprsky opět sjednoceny dalším polopropustným zrcadlem nebo rotujícím zrcadlovým sektorem a dopadají do vstupní štěrbině monochromátoru. To, že v daný okamžik dopadá na detekto pouze záření měrné nebo srovnávací, je zajištěno rotujícím modulátorem nebo přímo rotujícím zrcadlovým sektorem. Dvoupaprskový systém eliminuje fluktuace intenzity primárního zdroje a nestabilitu systému, protože měření se vždy vyhodnocuje porovnáním měrného a srovnávacího paprsku.



3.4.2. Využití

Uplatnění AAS je v celém spektru prvkové analýzy jako jsou: analýza životního prostředí, kontrola jakosti, klinická analýza, geologie, mikroelektronika, petrochemie, výzkum materiálů atd.

Jednotlivé druhy atomové absorpční spektrometrie se liší typem atomizátoru a způsobem vnášení analytu. A podle toho je rozdělujeme na AAS s atomizací v plameni tzv. plamenová AAS a AAS s elektrotermickou atomizací.

3.4.3. Plamenová atomová absorpční spektrometrie

Principem je převedení roztoku na aerosol ve zmlžovači a zavádění tohoto aerosolu do laminárního předmíchávaného plamene.

Vzorek se zmlží ve zmlžovači, vzniklá aerosol naráží na tzv. nárazovou kuličku, kde dojde inerčním záchytem k odstranění kapek přesahujících určitou velikost a dále je aerosol smíchán se smědí

oxidovadla a paliva. Jako palivo hořáku se nejčastěji používá acetylén, propan/butan nebo vodík. Oxidovadlem je vzduch nebo oxid dusný. Výsledná směs je vedena do hořáku tak, aby bylo zachováno laminární proudění. Celý tento proces se odehrává v mlžné komoře, která je vyrobena z inertního materiálu. Rychlost proudění štěrbinou hořáku přitom musí být 2 – 3 krát vyšší než je rychlost hoření.

Pro zmlžení vzorku se v FA AAS používají většinou pneumatické zmlžovače v soustředěném uspořádání. Jsou vyráběny z chemicky odolných materiálů. Speciálním typem zmlžovače využívaný také v FA AAS je tzv. vysokotlaký zmlžovač, který má vyšší účinnost, menší spotřebu vzorku a umožňuje zmlžování viskózních kapalin. Aerosol zde vzniká tříštěním velmi tenkého paprsku kapaliny o nárazové tělísko. Tenký paprsek se tvoří vtlačováním kapaliny do speciální trysky pod vysokým tlakem, kterého se docílí pomocí pumpy vysokotlakého kapalinového chromatografu. Vzorek je dávkován dávkovacím ventilem do stálého toku nosné kapliny.

Celý proces atomizace vycházejícího z kapalného vzorku můžeme popsat následujícími pochody:

- zmlžování roztoku – vznik mokrého aerosolu
- odpaření rozpouštědla – vznik suchého aerosolu
- vypaření částice
- chemické reakce se složkami přítomnými v plameni
- vznik volných atomů = atomizace
- ionizace a rekombinace
- termické excitace a deexcitace

3.4.4. AAS s elektrotermickou atomizací

Atomizace probíhá v elektrotermickém atomizátoru, který je

převážně vyroben z různých modifikací grafitu nebo z netěkavých kovů. Aby byl atomizátor chráněn před oxidací za vyšších teplot musí se pracovat v ochrané atmosféře argonu. Pro kovové atomizátory se používá směs argonu a vodíku.

Podle tvaru se elektronové atomizátory dělí na tzv. otevřené a uzavřené typy. V běžné analytické praxi se setkáváme s uzavřenými typy, které jsou převážně tvaru trubek a bývají chlazené vodou. Běžně se v elektrotermických atomizátorech analyzují kapalně vzorky, nebo dobře homogenizované suspenze, které je možné dávkovat stejným způsobem jako kapaliny. Analýza pevných vzorků není běžná. Hlavním problémem je provedení kalibrace.

Vlastní analytický proces při analýze má několik fází, které musí být důsledně optimalizovány. Spojením jednotlivých fází pak vzniká tzv. teplotní program, který charakterizuje celý analytický proces (ČERNOHORSKÝ T, JANDERA P, 1997).

3.5. Atomová emisní spektrometrie

Atomová emisní spektrometrie se zabývá zkoumáním a využitím záření vysílaného excitovanými atomy, popřípadě ionty prvků. Její počátky jako analytické metody spadají do šedesátých let 19. století (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004). Aby vzorek vysílal záření, musí se atomy prvku převést do excitovaného stavu dodáním energie tepelné v plameni, v elektrickém oblouku nebo elektrické jiskře a jiných tepelných zdrojích (STUŽKA V, 2000). Setrvání atomů v tomto nestabilním stavu je krátkodobé a přechodem zpět do stavů energií chudších vysílá vzorek záření, které je polychromatické. Skládá se ze záření určitých vlnových délek, charakteristických pro prvky přítomné v látce. Rozkladem vysílaného polychromatického záření optickým zařízením získáme čárové spektrum. Jsou-li ve zdroji přítomny i molekuly nebo radikály vzniklé tepelnou disociací, objeví se pásová

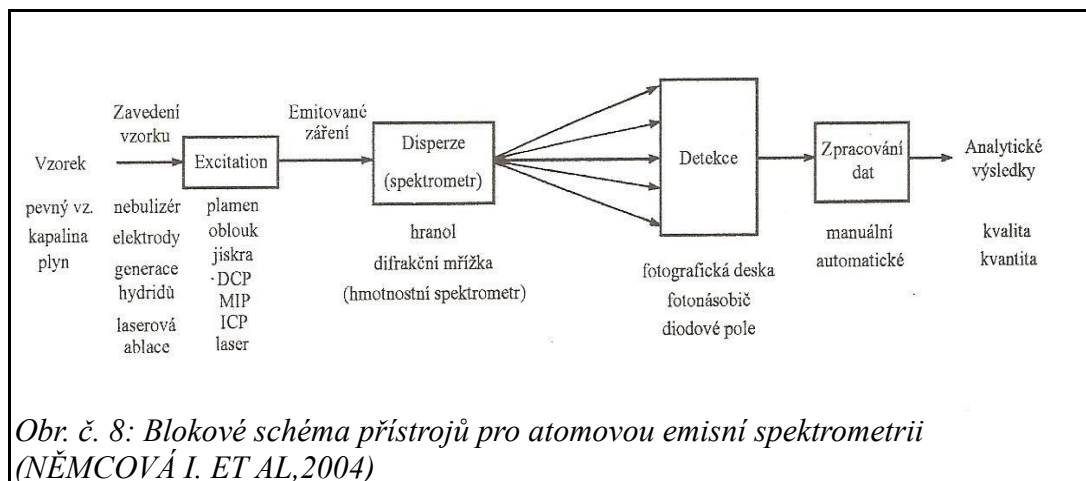
spektra těchto složek. Pásové spektrum je tvořeno velkým počtem těsně vedle sebe umístěných čar. K analytickým účelům se pásových spekter používá zřídka. Většinou znesnadňují analýzu, protože komplikují spektra a proto se je snažíme potlačit.

3.5.1. Analytické aplikace

Kvalitativní analýza je založena na identifikaci přítomných prvků podle polohy jejich čar ve spektru. Pro přesné určení vlnové délky je nutné porovnat polohu čar ve zkoumaném spektru s polohou čar známých prvků. Provádí se to většinou tak, že se vedle zkoumaného spektra nakopíruje známé spektrum kovu. Spektrum železa je snadno dostupné, má mnoho intenzivních čar v celém spektrálním rozsahu. Vlastní identifikace čar se pak pro běžné účely provádí pomocí srovnávacích tabulek, kde jsou uvedeny jednak stupnice vlnových délek a vyznačeny i důležité čáry prvků.

Kvantitativní postupy využívají závislosti mezi koncentrací a intenzitou jeho čáry. Intenzita čáry závisí na mnoho faktorech a není vždy stejná nejen pro stejné koncentrace různých prvků, ale ani pro stejné koncentrace téhož prvku. Proto je nutné při kvantitativních postupech provádět analýzu vždy jako analýzu srovnávací, tj. pomocí standardních roztoků (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

3.5.2. Přístroje emisní spektrometrie



3.5.2.1. Budící zdroje

V budícím zdroji je dodáním energie vzorek rozložen, atomizován a převeden do plynného prostředí, kde jsou atomy excitovány a vysílají záření (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

Používané budící zdroje se značně liší nejen dosahovanou teplotou, ale i celou řadou dalších parametrů ovlivňujících dosažené analytické výsledky (ČERNOHORSKÝ T. JANDERA P, 1997).

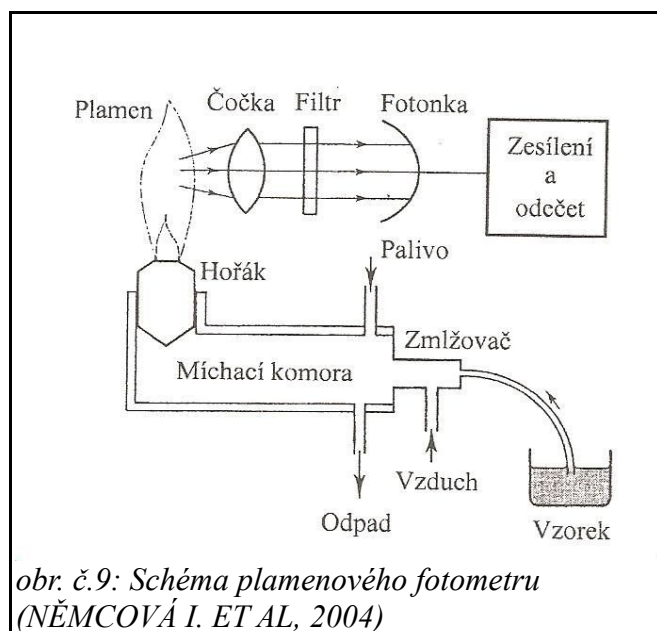
Jako zdroje budící energie je možno použít plamene, elektrického výboje, stejnosměrně vázanou plazmu, mikrovlně indukovanou plazmu, indukčně vázanou plazmu nebo laser. Podle používaného budícího zdroje jsou také jednotlivé atomové emisní metody nazvané.

Plamen

Plamen jako zdroj nižší budící energie excituje jen některé prvky

periodického systému, které mají nízké excitační potenciály. Jako jsou například alkalické kovy a kovy alkalických zemin. Získané spektrum je jednoduché, obsahuje méně spektrálních čar než spektrum buzené v elektrickém zdroji.

Použití plamene v emisní spektrometrii vedlo k rozvoji samostatné metody, plamenové fotometrie. Pro excitaci vzorků se užívá různých typů hořáků a plameny jsou realizovány směsí paliva a oxidantu, jejichž složení určuje teplotu plamene. Volba složení plamene je určována cílem měření i podmínkou, aby složky plamene v měřené oblasti vlnových délek měly co nejmenší vlastní emisi. Nejčastěji používaná směs je acetylen a vzduch.



Elektrický výboj

Excitací vzorku v plazmatech elektrických výbojů v elektrických zdrojích je atomům sledovaných prvků dodávána vysoká energie. Na rozdíl od excitace v plameni registrujeme spektrum bohaté na spektrální čáry a kromě čar excitovaných atomů mohou výt ve spektru i čáry ionizovaných prvků. Nejčastěji používanými zdroji jsou jiskra nebo oblouk

vytvořený mezi dvěma elektrodami a charakterizované proudovými i napěťovými charakteristikami.

Analyzované materiály se zpravidla po převedení do práškové formy umísťují do dutiny nosné elektrody, která je obvykle uhlíková. Pokud se analyzují vzorky roztoků, je možno je nejprve v dutině elektrody odpařit nebo je možné použít rotační elektrodu.

Plazmové zdroje

Plazma je obecně vysoce ionizovaný plyn, nejčastěji velmi snadno ionizovatelný vzácný plyn – argon. Plazma je definována jako plyn, který je z více než 1% ionizován. Můžeme ji získat pomocí elektrického výboje v plazmovém plynu. Elektrický výboj může být proveden několika způsoby, podle kterých rozlišujeme: stejnosměrná plazma (DCP), mikrovlně indukovaná plazma (MIP) a indukčně vázaná plazma (ICP).

Stejnosměrná plazma vzniká průchodem konstantního proudu vysoké hodnoty plazmovým plynem mezi dvěma nebo třemi elektrodami. Roztok vzorku je ve zmlžovači rozprašován nosným plynem přímo do výboje plazmatu. Třetí elektroda je použita pro zvýšení stability plamového výboje. Teplota plazmy je vysoká, ale pro měření je použita oblast s menší teplotou z důvodu menší emise pozadí plazmy.

Mikrovlně indukovaná plazma vzniká v rezonanční dutině výbojové trubice, kterou protéká helium, dodáním energie z mikrovlného zdroje. Může být využita i pro stanovení nekovových prvků.

Indukčně vázaná plazma vzniká indukčním přenosem vysokofrekvenční energie z budícího vysokofrekvenčního generátoru cívkou.

Laserový budící zdroj

Pulzní laserový paprsek velké intenzity je mikroskopem

fokusován na vzorek umístěný mezi párem elektrod z vysoce účinného grafitu. Laserový puls spouští výboj mezi elektrodami odpařením části vzorku. Emitované záření přímo registrujeme disperzním systémem spektrometru a má stejný charakter jako spektrum vzorku získané jiskrovým výbojem. Využívá se hojně k přímému stanovení biologických materiálů, díky využití fokusace laseru na velmi malou plochu (NĚMCOVÁ I, ET AL, 2004).

3.5.2.2. Monochromátor

Monochromátor slouží k vymezení úzkého spektrálního intervalu ze svazku paprsků, dopadajících na jeho vstupní stěrbinu (ČERNOHORSKÝ T. JANDERA P, 1997). Monochromátorem, nebo-li disperzním prvkem, může být hranol nebo mřížka, která společně se systémem rovinných a dutých zrcadel tvoří vlastní optickou část zařízení.

Disperze hranolu je funkcí vlnové délky. U téhož spektrografu budou tedy lépe rozlišeny dvě blízké čáry v oblasti kratších vlnových délek. Proto jsou hranolové přístroje vhodné spíše pro sledování čárových spekter v UV oblasti pod 400 nm. Zatímco u mřížkových přístrojů není závislá na vlnové délce sledovaných čar spektra a proto se disperzních mřížkových prvků využívá pro široké rozmezí vlnových délek u UV, VIS i blízké IČ oblasti.

Právě rozlišovací schopnost přístroje je dána především rozlišovací schopností disperzního prvku. Je definována jako schopnost rozlišit vlnové délky dvou čar, které se od sebe liší o malý interval vlnové délky (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

3.5.2.3. Detektor

Detektor slouží k zachycení emisních spekter. Používá se buď fotografická detekce nebo fotoelektrické detektory (ČERNOHORSKÝ T.

JANDERA P, 1997).

Detekce záření pomocí fotografických desek nebo filmů s citlivou vrstvou fotografické emulze položilo základ spektrografickým metodám, ale v současnosti se již tento způsob detekce prakticky nevyužívá.

Při využití přímé fotoelektrické detekce je v zobrazovací rovině spektra umístěna výstupní štěrbina a za ní fotonásobič. Fotonásobič je tvořen fotokatodou, anodou a soustavou dynod, které jsou umístěny v evakuované baňce (NĚMCOVÁ I. ET AL, 2004).

4. Praktická část

4.1. Příprava vzorků

Všichni potkani byli živeni dietami *ad libitum* standardní laboratorní dietou a standardní laboratorní dietou obohacenou o železo po dobu 3 měsíců. Potkani byly rozděleny do několika skupin.

1.skupina: samci, živeni SLD do konce pokusu, v 9. týdnu odběr 2 ml krve

2.skupina: samice, živené SLD do konce pokusu, v 9. týdnu odběr 2 ml krve

3.skupina: samci, živeni SLD obohacenou o železo, v 9. týdnu odběr 2 ml krve

4.skupina: samice, živené SLD obohacenou o železo, v 9. týdnu odběr 2 ml krve

5.skupina: samci, živeni SLD, 1 x týdně odběr 2 ml krve

6.skupina: samice, živené SLD, 1 x týdně odběr 2 ml krve

7.skupina: samci, živeni SLD obohacenou o železo, 1 x týdně odběr 2 ml krve

8.skupina: samice, živené SLD obohacenou o železo, 1 x týdně odběr 2 ml krve

4.1.1. Příprava diety

Příprava po 12 kg: 9 kg sypké diety + 3 kg diety SLD

Připravenou dietu jsme rozdělili na 2 poloviny. K jedné jsme přidali pouze vodu a do druhé poloviny jsme přidali vodu s rozpuštěnými 30 tabletami železa. Potkani se SLD dostávali k pití černý čaj uvařený z filtrované vody zbavené železa.

Příprava SLD: Kasein – 780 g, DL-methionin – 30 g, kukuřičný škrob – 1,48 kg, cukr moučka – 180 g, celulóza – 150 g, cholin chlorid – 27 g, cystein – 15 g, arginin – 3 g, mix minerálů – 150 g, mix vitamínů – 27 g, kukuřičný olej – 166 g, vitamín A – 1 tobolka, vitamín D – 27 000 IU (1/10 ampule), vitamín K – 3 kapky, vitamín E - ¼ ampule, pyridoxin - ½ ampule, cyanokobalamin – 0,15 ml.

Diety jsme smíchali s malým množstvím vody, vytvořili jsme válečky na mlýnku, které byly sušeny v sušičce potravin do suchého stavu.

4.2. Princip metody

Atomizace probíhá v grafitové kyvetě, která je elektricky vyhřívána až na teplotu 3000 ° C s přesným nastavením a kontrolou teploty a času podle požadavku jednotlivých fází. Uprostřed grafitové kyvety je 2 mm otvor pro přívod vzorku ve formě roztoku. Pipetování vzorku je automatické. Grafitová kyveta je umístěna v ocelovém plášti chlazeném vodou. Celý proces probíhá v inertní atmosféře argonu, která zabraňuje oxidaci.

Pracovní cyklus atomizace má 4 fáze:

1. Sušící fáze, kde probíhá odstranění rozpouštědla (100 °C, 30 s).
2. Zpopelňovací fáze, při které dochází k odstranění organického materiálu nebo matrice vzorku (200 -1500 °C, 10-60 s).
3. Při atomizační fázi dochází k uvolnění atomů (až 3000 °C, 1-3s).
4. Při poslední čistící fázi dochází k vypálení všech reziduí z kyvety (teplota se nastavuje o 200 o C vyšší než ve 3. fázi, 1-3 s).

4.3. Materiály

Přístroje:

analytické váhy SARTORIUS RC 210D

termolab TECHNE DRI – BLOCK DB

atomový absorbční spektrofotometr AAS DUO 240 FS + 280Z

Reagencie:

železnatý standart MERCK 1000 mg/l

65 % superčistá HNO_3

30% superčistý H_2O_2

destilovaná voda

proplachovací roztok pod autosampler: deionizovaná voda + HNO_3 +

methanol

ředící roztok : deionizovaná voda

modifikátory:

- paladium 1 g/l
- kyselina askorbová 1 g/100 ml

Laboratorní potřeby:

Okalibrované zkumavky

Eppendorfské zkumavky

stojan na zkumavky

pipety

špičky

popisovače

4.4. Postup

4.4.1. Mineralizace vzorků tkání

1. Vzorek tkáně jsme přenesli čistou špičkou do čisté Eppendorfské zkumavky a nechali jsme sušit 90 min při 120 °C v termobloku.
2. Po vysušení do konstatní navážky jsme tkáň zvážili na analytických vahách a navážku jsme poznamenali pro pozdější výpočet.
3. Do okalibrované zkumavky jsme napipetovali 1 ml kyseliny dusičné a 0,5 ml peroxidu vodíku. K připravené směsi jsme přenesli zvážený, vysušený vzorek.
4. Celou směs jsme zahřívali v termobloku při 90 °C do úplného rozložení vzorku.
5. Nakonec jsme vzorek doplnili do 10 ml deionizovanou vodou.

4.4.2. Měření v atomizátoru

1. Nejdříve jsme připravili vzorky pro samotné měření. Do originálního kepu do autosampleru ETAAS jsme napipetovali 50 ul zmineralizované tkáně a 50 ul vody, vše jsme důkladně promíchali pipetou.
2. Výsledek jsme přepočítali na ug/g suché tkáně podle vzorce:
$$\text{ug/g s.t.} = \text{výsledek (ug/l * ředění * doplnění) / navážka tkáně (g) / 1000}$$

4.5. Vyhodnocení

Skupiny potkanů č. 1 a 2 slouží jako kontrolní skupiny, jelikož byly živě až do konce pokusu standardní laboratorní stravou bez pravidelných odběrů krve. U potkanů samců skupiny č. 3, kterým byla

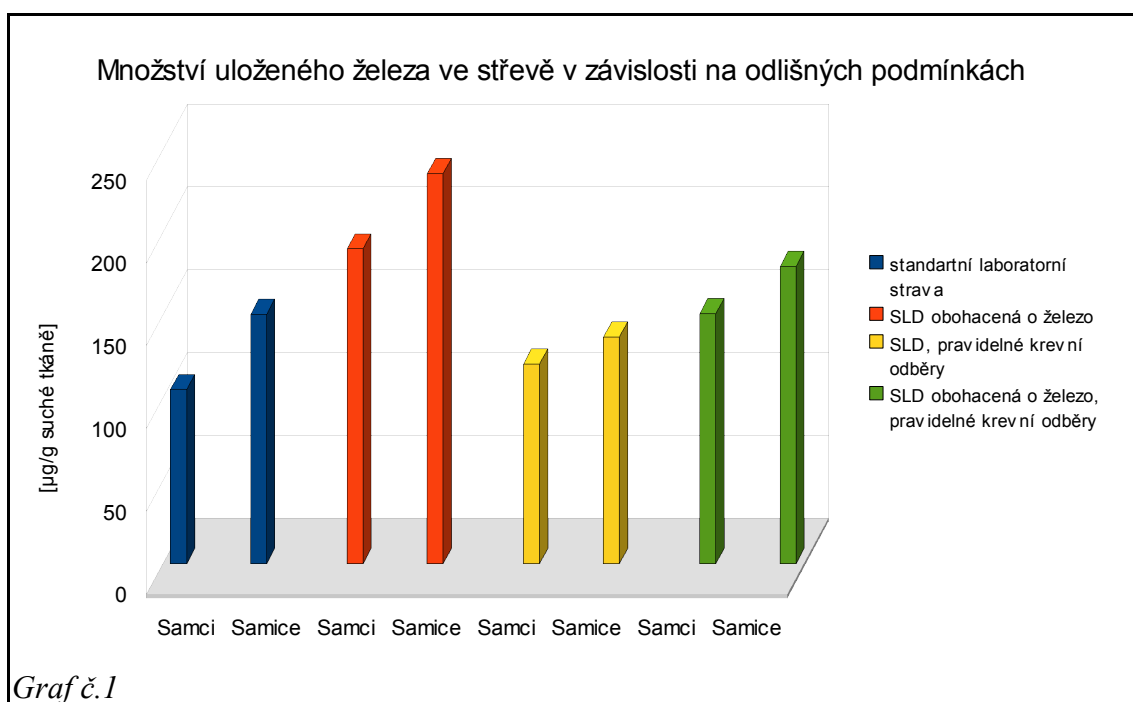
podávána SLD obohacená o železo, byla naměřená hodnota obsahu železa ve střevě i slezině vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Stejně tak tomu bylo i u potkanů samic skupiny č. 4 ve srovnání s jejich kontrolní skupinou. U skupiny samců č. 5 byla naměřená hodnota obsahu železa ve srovnání s kontrolní skupinou nižší ve slezině, ale vyšší ve střevě. U samic skupiny č. 6 byly naměřené hodnoty jak ve slezině tak ve střevě nižší ve srovnání s kontrolní skupinou. U poslední skupiny samců č. 7 byly hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou ve slezině nižší a ve střevě vyšší. A u poslední skupiny samic č. 8 byly hodnoty ve srovnání skupinou ve slezině nižší a ve střevě vyšší. U všech skupin samic byly naměřené hodnoty vyšší v porovnání se skupinami samců.

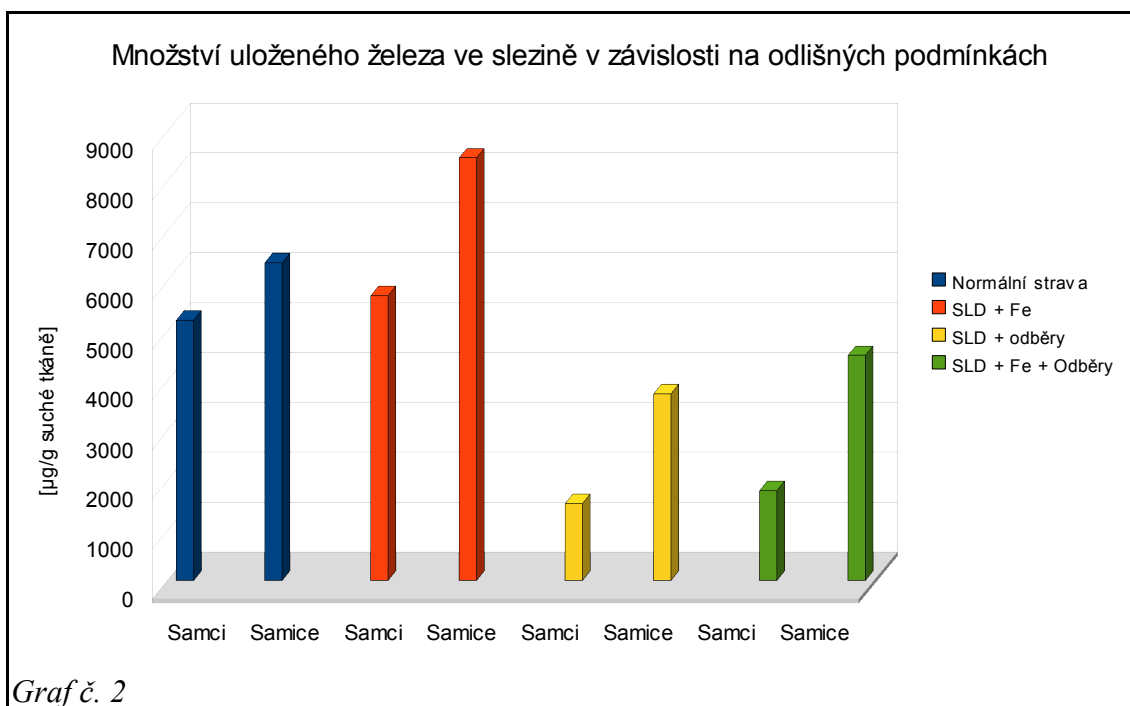
Tab. č. 1: Průměrné hodnoty naměřeného obsahu železa u potkanů samců				
skupina	Slezina [µg/g suché tkáně]	Standardní deviace	Střevo [µg/g suché tkáně]	Standardní deviace
1	5212	772	105,18	13
3	5701	1028	190	43
5	1537	543	120,4	11
7	1794	696	150,9	30,3

Tab. č. 2: Průměrné hodnoty naměřeného obsahu železa u potkanů samic				
skupina	Slezina [µg/g suché tkáně]	Standardní deviace	Střevo [µg/g suché tkáně]	Standardní deviace
2	6365	1978	150,6	53,3
4	8466	1970	235,6	57,6
6	3742	1537	136,8	24,8
8	4510	1354	179,5	36,4

Tab. č. 3: Doplnující výsledek: Obsah železa v játrech stanovený stejnou metodikou [$\mu\text{g/g}$]

Skupina		Obsah železa v játrech [$\mu\text{g/g}$]
1	M-SLD	594,6 \pm 163,0 (p<0,002)
2	F-SLD	1376,0 \pm 166,1
3	M-Fe	779,6 \pm 129,5 (p<0,002)
4	F-Fe	1406,1 \pm 157,6
5	M-SLD-O	537,7 \pm 123,5
6	F-SLD-O	812,8 \pm 104,8
7	M-Fe-O	701,5 \pm 86,9
8	F-Fe-O	1054,8 \pm 140,6





5. Diskuze

Smyslem designu celého experimentu bylo ověřit, zda pravidelné odběry krve u potkanů vedou ke změně fyziologických procesů zapojených do nakládání s železem a zda jsou rozdíly mezi samci a samicemi.

Výsledky, které byly získány v rámci vypracování diplomové práce jsou součástí většího experimentu. V diskuzi se budu věnovat hlavně zásobám železa v organismu a jejich regulaci, ostatní výsledky budou využity jen k podpoření hypotézy.

Hlavní zásobárnou železa v organismu jsou játra, ale i slezinu lze považovat za orgán, kde dochází ke kumulaci železa. Koncentrace železa v játrech u jednotlivých skupin měly stejný trend jako ve slezině. Z komplexních výsledků pokusu je zřejmé, že k utilizaci železa se staví celý organismus jako celek.

Střevo je naopak orgánem, ve kterém je železo do organismu vstřebáváno a je v něm umístěna řada regulačních mechanismů, které vstup železa do organismu usnadňují, nebo naopak blokují (řada z nich je popsána v literárním úvodu).

Samice jsou ve vztahu k metabolismu železa ve velmi odlišné situaci než samci, protože mají zásadně odlišnou hormonální výbavu a dochází u nich k neustálému „spotřebování“ železa při opakovaných březostech a porodech. Z našich výsledků vyplývá, že samice za všech okolností udržují vyšší zásoby železa v zásobárnách (v našem případě ve slezině) a není ani pro ně důležité, zda přijímají standardní laboratorní dietu nebo dietu obohacenou o železo. U samců jsou zásoby železa vždy nižší, při provádění pravidelných krevních odběrů pak významně. V zásadě lze konstatovat, že pro udržení homeostázy železa stačí standardní laboratorní dieta, obohacení železem situaci zásadně nezmění.

Množství železa ve tkáni střeva je možné zhodnotit ze dvou úhlů

pohledu, které jsou zásadně odlišné. Střevo má zásadní regulační roli v příjmu železa. Naměřené hodnoty ve střevě mohou být dány buď železem, které v enterocytech „stagnuje“ a má nebo nemá být vstřebáno do organismu nebo mohou být dány hodnotami, které vyjadřují „flow“ železa do organismu. Z údajů, které máme k dispozici, se přikláníme k názoru, že jde o železo v enterocytech, které bude regulačními mechanismy „přijato nebo odmítnuto“. Zde je více patrný vliv diety obohacené o železo, u skupin s železem obohacenou dietou jsou hodnoty obsahu železa ve tkáních vyšší. Jedná se ale s velkou pravděpodobností o železo, které bude s odloupanými enterocyty eliminováno z organismu.

6. Závěr

Předmětem závěrečné kapitoly této diplomové práce je zhodnocení výsledků.

Zjistili jsme, že pravidelné odběry krve snižují dosavadní zásoby železa ve slezině, zatímco v enterocytech se jejich obsah nepatrně zvyšuje. To naznačuje zvýšené vstřebávání železa z potravy. Dále z výsledků vyplynulo, že zvýšený obsah železa ve stravě způsobuje jeho zvýšené ukládání v enterocytech i ve slezině. Další rozdíly ve fyziologických procesech ukládání železa jsou mezi samicemi a samci. U samic dochází ke zvýšené absorpci a ukládání železa v organizmu než u samců, na podkladě rozdílné hormonální výbavy.

7. Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorbní spektrometrie
ACD	anemia of chronic disease
ALD	alkoholová nemoc jater
APR	acute phase response
ATP	adenosintrifosfát
eALAS	erytroidní forma syntázy kyseliny delta-aminolevulové
DCYTB	duodenal cytochrome b-like ferrireductase
DMT1	divalent metal transporter
EPO	erythropoetin
FA AAS	flame atomization AAS
FNP	ferroportin
HCP 1	hem carrier protein 1
HH	hereditární hemochromatoza
HFE	hemachromatosis protein
HNO ₃	kyselina dusičná
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IČ	infračervená oblast
IL – 6	interleukin 6
IRE	iron-responsive elements
IRP	iron-responsice proteins
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného
SLD	standardní laboratorní dieta
TFR1	transferinový receptor 1
TFR2	transferinový receptor 2

UV	ultrafialové záření
VIS	viditelná oblast

8. Literatura

1. Anderson GJ, Darshen D, Wilkins SJ, Fraze DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 2007, roč. 20, č. 3-4, s. 665-674.
2. Anderson GJ, Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Millard KN, Murphy TL, McKie AT, Vulpe CD. Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem Soc Trans*, 2002, roč. 30, č. 4, s. 724-726.
3. Babbit JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*, 2007, roč. 117, č. 7, s. 1933-1939.
4. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang HJ, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, roč. 290, č. 1, s. 156-163.
5. Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P. Calcium supplementation: Effects on iron absorption. *American J Clinical Nutrition*, 1991, roč. 53, č. 1, s. 106-111.
6. Černohorský Tomáš, Jandera Pavel. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. 214 s. ISBN 80-7194-114-X.
7. Darshan D, Anderson GJ. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroenterol*, 2007, roč. 13, č. 35, s. 4737-4745.
8. Drake SF, Morgan EH, Herbison CE, Delima R, Graham RM, Chua

AC, Leedman PJ, Fleming RE, Bacon BR, Olynyk JK, Trinder D. Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, roč. 292, č. 1, s. 323-328.

9. Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis*, 2005, roč. 25, č. 4, s. 411-419.

10. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology*, 2002, roč. 123, č. 3, s. 835-844.

11. Frazer DM, Anderson GJ. Recent advances in intestinal iron transport. *Curr Gastroenterol Rep*, 2005, roč. 7, č. 5, s. 365-372.

12. Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, roč. 289, č. 4, s. 631-635.

13. Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, roč. 293, č. 3, s. 525-531.

14. Fu YM, Li SP, Wu YF, Chang YZ. Identification and expression analysis of hepcidin-like cDNAs from pigeon (*Columba livia*). *Mol Cell Biochem*, 2007, roč. 305, č. 1-2, s. 191-197.

15. Ganz T. Heparin-a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, roč. 306, s. 183-189.

16. Hu X, Camus AC, Aono S, Morrison EE, Dennis J, Nusbaum KE, Judd RL, Schi J. Channel catfish hepcidin expression in infection and anemia. *Comp Immunol Microbiol Infects Dis*, 2007, roč. 30, č. 1, s. 55-69.
17. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*, 2005, roč. 115, č. 8, s. 2187-2189.
18. Chen H, Huang G, Su T, Gao H, Attieh ZK, McKie AT, Anderson GJ, Vulpe CD. Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency. *J Nutr*, 2006, roč. 136, č. 5, s. 1236-1241.
19. Jacolot S, Féres C, Mura C. Iron responses in hepatic, intestinal and macrophage/monocyte cell lines under different culture conditions. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, roč. 41, č. 1, s. 100-108.
20. Karlíček Rolf, Polášek Miroslav, Pospíšilová Marie, Solich Petr. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. 291 s. ISBN 80-7184-095-5.
21. Kelleher SL, Lönnerdal B. Zinc supplementation reduces iron absorption through age-dependent changes in small intestine iron transporter expression in suckling rat pups. *J Nutr*, 2006, roč. 136, č. 5, s. 1185-1191.
22. Komárek Josef. *Atomová absorpční spektrometrie*. 1. Vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2000. 85 s. ISBN 80-210-2500-X.
23. Kong WN, Chang YZ, Wang SM, Zhai XL, Shang JX, Li LX, Duan XL. Effect of erythropoietin on hepcidin, DMT1 with IRE, and hephaestin

gene expression in duodenum of rats. *J Gastroenterol*, 2008, roč. 43, č. 2, s. 136-143.

24. Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G, Cetin Y. Pancreatic beta-cells expression hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinol*, 2008, roč. 197, č. 2, s. 241-249.

25. Leung PS, Srani SK, Mascarenhas M, Chuchill LJ, Debnam ES. Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression. *Gut*, 2005, roč. 51, č. 10, s. 1391-1395.

26. Litwack Gerald. Human biochemistry and Disease. California: Academic PR, 2008. 1254 s. ISBN 978-0-12-452815-4.

27. Lönnerdal B, Kelleher SL. Iron metabolism un infants and children. *Food Nutr Bull*, 2007, roč. 28, č. 4, s. 491-499.

28. Ludwiczek S, Theurl I, Artner-Dworzak E, Chorney M, Weiss G. Duodenal HFE expression and hepcidin levels determine body iron homeostasis: modulation by genetic diversity and dietary iron availability. *J Mol Med*, 2004, roč. 82, č. 6, s. 373-382.

29. Ludwiczek S, Theurl I, Bahram S, Schümann K, Weiss G. Regulatory networks for the control of body iron homeostasis and their dysregulation in HFE mediated hemochromatosis. *J Cell Physiol*, 2005, roč. 204, č. 2, s. 489-499.

30. Marro S, Barisani D, Chiabrando D, Fagoonee S, Muckenthaler MU, Stolte J, Meneveri R, Haile D, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. Lack of haptoglobin affects iron transport across duodenum by modulating ferroportin expression. *Gastroenterology*, 2007, roč. 133, č. 4, s. 1261-1271.

31. Mena NP, Esparza AL, Núñez MT. Regulation of transepithelial transport of iron by hepcidin. *Biol Res*, 2006, roč. 39, č. 1, s. 191-193.
32. Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés V, Núñez MT. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, roč. 294, č. 1, s. 192-198.
33. Millard KN, Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut*, 2004, roč. 53, č. 5, s. 655-660.
34. Muckenthaler MU, Rodrigues P, Macedo MG, Minana B, Brennan K, Cardoso EM, Hentze MW, de Sousa M. Molecular analysis of iron overload in beta2-microglobulin-deficient mice. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, roč. 33, č. 2, s. 125-131.
35. Němcová Irena, Čermáková Ludmila, Rychlovský Petr. *Spektrometrické analytické metody I. 2. Vydání*. Praha: Karolinum, 2004. 166s. ISBN 80-246-0776-X.
36. Oates PS, Ahmed U. Molecular regulation of hepatic expression of iron regulatory hormone hepcidin. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, roč. 22, č. 9, s. 1378-1387.
37. Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y, Fujimoto Y, Kohgo Y. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007, roč. 31, č. 1, s. 2-8.
38. Liu YQ, Duan XL, Chang YZ, Wang HT, Qian ZM. Molecular analysis of increased iron status in moderately exercised rats. *Mol Cell Biochem*,

2006, roč. 282, č. 1-2, s. 117-123.

39. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004, roč. 36, č. 1, s. 77-82.

40. Pecka, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR, s.r.o., 2006. 304 s. ISBN 80-86682-02-1.

41. Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanism of disease: The role of hepcidin in iron homeostasis -implications for hemochromatosis and other disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2004, roč. 1, č. 1, s. 39-45.

42. Picard V, Govoni G, Jabado N, Gros P. Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transport iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool. *J Biol. Chem.*, 2000, roč. 275, č. 10, s. 35738-35745.

43. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in diagnosis of iron deficiency. *Blood*, 1997, roč. 89, č. 3, s. 1052-1057.

44. Racek, Jaroslav. *Novinky v metabolismu železa*. Pardubice: 16.9.2008. Dostupné z:
http://209.85.129.132/searchq=cache:gXKnkJ6FkMJ:www.stapro.cz/fons/prednasky/5_3.pdf+struktura+hepcidinu&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a.

45. Shayeghi M, Latunde-dada GO, Oakhill JS, Takeuchi K, Laftah A, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpsom RJ, McKie AT. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 2005, roč. 122, č. 5, s. 789-801.
46. Sheikh N, Dudas J, Ramodori G. Changes of gene expression of iron regulatory proteins during turpentine oil-induced acute-phase response in the rat. *Lab Invest*, 2007, roč. 87, č. 7, s. 713-725.
47. Steele TM, Frazer DM, Anderson GJ. Systemic regulation of intestinal iron absorption. *IUBMB Life*, 2005, roč. 57, č. 7, s. 499-503.
48. Stůžka Václav. *Analytická atomová optická spektrometrie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci: 2000. 81s. ISBN 80-244-0206-8.
49. Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS, Lafuse WP. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol*, 2007, roč. 82, č. 4, s. 934-945.
50. Theurl I, Ludwiczek S, Eller P, Seifert M, Artner E, Brunner P, Weiss G. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload. *J Hepatol*, 2005, roč. 43, č. 4, s. 711-719.
51. Vokurka Martin, Hugo Jan at al. *Velký lékařský slovník*. 5. vydání. Praha: Maxdorf s.r.o., 2005. 1001 s. ISBN 80-7345-058-5.
52. Vokurka, Martin. *Železo a lidský organizmus*. 2009. dostupné z: <http://www.martinvokurka.cz/>.
53. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron

metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*, 2005, roč. 2, č. 6, s. 399-409.

54. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, 1996, roč. 145, č. 5, s. 523-531.

55. Weinberg, ED. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2. vydání Washington: ASM Press, 1995. 366 s. ISBN 9781555810856.
Kapitola 6: Acquisition of Iron and Other Nutrients In Vivo, s. 79-94.

56. West AR, Thomas C, Sadlier J, Oates PS. Haemochromatosis protein is expressed on the terminal web of enterocytes in proximal small intestine of the rat. *Histochem Cell Biol*, 2006, roč. 125, č. 3, s. 283-292.