

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



METABOLIZMUS ŽELEZA, OXIDAČNÍ STRES A PROGRESE ATEROSKLERÓZY

MUDr. Petr Syrovátka

Praha, 2011

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	MUDr. Petr Syrovátka
Název dizertační práce:	Metabolismus železa, oxidační stres a progresse aterosklerózy
Název dizertační práce anglicky:	Iron metabolism, oxidative stress and progression of atherosclerosis
Obor:	Fyziologie a patofyziologie člověka
Předseda oborové rady:	Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
Školící pracoviště:	II. interní klinika 3. LF UK a FNKV Praha
Školitel:	Doc. MUDr. Pavel Kraml, PhD.
Školitel konzultant:	Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Práce vznikla v letech 2003 – 2010 v rámci kombinované formy postgraduálního studia biomedicíny na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

PODĚKOVÁNÍ:

Téma mé dizertační práce, která se věnuje vztahu mezi metabolizmem železa a aterosklerózou, vzniklo již za mého pregraduálního studia ve 4. ročníku na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Mým školicí telem byl od mých vědeckých začátků Doc. MUDr. Pavel Kraml, PhD., kterému patří mé srdečné poděkování za jeho přátelské vedení, energii, čas, nápady i ochotu poradit, kdykoliv jsem ho o to žádal. Zároveň chci poděkovat přednostovi II.interní kliniky FNKV a děkanovi 3. LF UK prof. MUDr. Michalu Andělovi, CSc. za to, že souhlasil s mým postgraduálním studiem na 3. lékařské fakultě a stal se zároveň mým spoluškolicí telem. Umožnil tak mé začlenění do výzkumné základny metabolické skupiny kliniky a získání vzdělání v oboru vnitřního lékařství. Můj velký dík patří Janě Potočkové, za její pomoc s analýzou krevních vzorků, nesmírně pečlivé vedení databáze a časově náročné statistické zpracovávání dat. Za zpracování vzorků a měření parametrů oxidačního stresu bych rád poděkoval týmu z Ústavu lékařské biochemie 1. LF UK vedeném prof. MUDr. Stanislavem Štípkem DrSc., MUDr. Jiřině Crkovské, MUDr. Lence Fialové, CSc. a MUDr. Martinovi Vejražkovi PhD. V neposlední řadě mé poděkování patří Mgr. Katarině Hulíkové z Ústavu imunologie 3. LF UK za stanovování exprese povrchových receptorů na monocytech periferní krve pomocí průtokové cytometrie. Za pomoc se statistickou analýzou rovněž děkuji Mgr. Skibové z IKEMu Praha. Děkuji také mému školiteli Doc. MUDr. Pavlu Kramlovi, PhD., MUDr. Tomášovi Markovi, CSc. z Kliniky kardiologie IKEM a prim. MUDr. Ondřeji Škodovi z Neurologického oddělení nemocnice Jihlava za to, že mě naučili principy ultrazvuku, duplexní sonografické vyšetření tepen a echokardiografii. Ze srdce děkuji mé ženě Kristýně za to, že mě v mé práci podporovala a trpělivě snášela období, kdy jsem kvůli práci nebyl doma nebo studoval. Také děkuji za podporu celé své rodině a zejména mojí matce.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že v dizertační práci jsou použita originální data z výzkumu provedeného v rámci mého kombinovaného postgraduálního studia na II. interní klinice FNKV a 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Dizertační práce byla podpořena z finančních zdrojů výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 0021620814 – Prevence, diagnostika a terapie diabetes mellitus, metabolických a endokrinních poškození). Prohlašuji, že jsem na této práci pracoval samostatně a že jsem nepoužil jiné zdroje a literaturu než ty, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze dne 10. ledna 2011

MUDr. Petr Syrovátka

SOUHRN

FERITIN, OXIDAČNÍ STRES A INZULÍNOVÁ REZISTENCE

Cíl: Cílem naší průřezové studie bylo posoudit vztah mezi endogenními zásobami železa, oxidačním stresem a inzulínovou rezistencí v souboru zdravých mužů primární prevence kardiovaskulárních onemocnění.

Metodika: Studie se zúčastnilo celkem 151 dobrovolníků ve věku 35 - 60 let. U všech jsme vyšetřovali antropometrické ukazatele, parametry metabolického syndromu, inzulínovou rezistenci, zánětlivé markery, parametry oxidačního stresu a parametry endotelové dysfunkce.

Výsledky: Hladina sérového feritinu korelovala pozitivně s obvodem pasu, body mass indexem, inzulínovou rezistencí, hladinou triacylglycerolů a inverzně s hladinou HDL cholesterolu. Dále jsme našli pozitivní korelaci mezi feritinem a oxidovanými LDL a pokročilými produkty oxidace proteinů po adjustaci k věku, obvodu pasu, body mass indexu a k měřeným parametrům zánětu (vysoce senzitivní C-reaktivní protein, fibrinogen, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor-alfa). V krokové multivariační regresní analýze byli nezávislými determinantami sérové hladiny feritinu triacylglyceroly, obvod pasu a aminotransferázy.

Závěr: Naše výsledky dokladují vztah mezi plazmatickým feritinem a oxidativně modifikovanými lipidy a proteiny *in vivo*. Zvýšené endogenní zásoby železa mohou přispívat k inzulínové rezistenci prostřednictvím zvýšeného oxidačního stresu v kohortě zdravých mužů.

ENDOGENNÍ ZÁSoby ŽELEZA A ATEROSKLEROTICKÉ POSTIŽENÍ KAROTICKÝCH TEPEN

Cíl: Cílem naší studie bylo vyhodnotit vliv zvýšených zásob železa na přítomnost asymptomatické aterosklerózy v kohortě zdravých mužů. Očekávali jsme, že zvýšené zásoby železa budou pozitivně korelovat s tloušťkou intimy-medie společné karotické tepny nezávisle na tradičních rizikových faktorech aterosklerózy a že nízká exprese transferinových receptorů na povrchu monocytů v periferní krvi bude pozitivně asociována s větší šířkou intimy-medie a nižší elasticitou společné karotické tepny.

Metodika: V této průřezové studii, která zahrnovala 72 zdravých mužů, jsme měřili poměr koncentrace plazmatických cirkulujících transferinových receptorů ke koncentraci feritinu, parametry zánětu a oxidačního stresu, plazmatické lipidy, solubilní CD163, markery endotelové dysfunkce, ultrasonograficky šířku intimy-medie a parametry elasticity společné karotické tepny a expresi transferinových receptorů (CD71) a scavengerových receptorů typu B (CD36) na povrchu cirkulujících monocytů v periferní krvi.

Výsledky: Poměr transferinový receptor/feritin a koncentrace plazmatického feritinu signifikantně korelovaly se šířkou intimy-medie arteria carotis communis. Multivariační regresní analýza potvrdila, že je korelace poměru transferinový receptor/feritin a šíře intimy-medie arteria carotis communis nezávislá na tradičních rizikových faktorech aterosklerózy. Poměr TfR/F koreloval i s dalšími ukazateli aterosklerózy – fibrinogem, sCD163 a interleukinem-8. Muži s nejvyšší expresí transferinového receptoru na monocytech (hodnoceno průtokovou cytometrií) vykazovali signifikantně vyšší poddajnost arteria carotis communis, nižší hodnoty indexu tuhosti a vyšší hladinu plazmatického E-selektinu v porovnání s muži s nízkou expresí transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů. Rovněž jsme v celém souboru mužů pozorovali pozitivní korelaci mezi expresí CD71 na povrchu cirkulujících monocytů a poddajností arteria carotis communis.

Závěr: Naše studie prokázala nezávislý vztah mezi zásobami železa, vyjádřeno jako poměr TfR/F, a asymptomatickou aterosklerózou karotických tepen. Poměr TfR/F dále vykazoval nezávislou negativní korelaci s fibrinogem a pozitivní korelaci s sCD163 a IL-8. Zároveň jsme našli pozitivní korelaci mezi expresí CD71 na povrchu cirkulujících monocytů a poddajností arteria carotis communis.

SUMMARY

FERRITIN, OXIDATIVE STRESS AND INSULIN RESISTENCE

Aim: The aim of our cross-sectional study was to assess the relationships between body iron stores, oxidative stress and impaired insulin sensitivity in a cohort of healthy men in primary prevention of cardiovascular disease.

Methods: We examined 151 volunteers, aged 35 - 60 years. Anthropometric parameters, markers of metabolic syndrome, insulin resistance, inflammatory markers, parameters of oxidative stress and parameters of endothelial dysfunction were measured.

Results: Ferritin correlated positively with waist circumference, body mass index, impaired insulin sensitivity, plasma triglycerides and inversely with high-density lipoprotein cholesterol. We observed positive correlations between ferritin, oxidized low-density lipoprotein and advanced oxidation protein products after adjustment for age, waist circumference, body mass index and measured inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α). In a stepwise multiple regression analysis, triglycerides, waist circumference and elevated transaminases were independent determinants of the serum ferritin level.

Conclusions: Our results provide evidence for a relationship between plasma ferritin and oxidative modification of lipids as well as proteins in vivo. Higher body iron stores may contribute to impaired insulin sensitivity through increased oxidative stress in a cohort of healthy men.

IRON STORES ARE ASSOCIATED WITH ASYMPTOMATIC CAROTID ATHEROSCLEROSIS

Introduction: The aim of our study was to assess the impact of increased iron stores on the presence of asymptomatic atherosclerosis in a cohort of healthy men. We anticipated that higher iron stores would be positively associated with the common carotid intima-media thickness, independently of traditional risk factors of atherosclerosis and that lower monocyte transferrin receptor expression would be associated with lower carotid artery compliance and higher intima-media thickness.

Methods: In this cross-sectional study that included 72 healthy men we measured the ratio of plasma-circulating transferrin receptors concentration to plasma ferritin concentration, certain inflammatory and oxidative stress markers, plasma lipids, soluble CD163, markers of endothelial dysfunction and the ultrasonography of intima-media thickness and compliance of common carotid artery. Moreover, we assessed

the expression of transferrin receptors (CD71) and scavenger receptors type B (CD36) on monocytes by flow cytometry.

Results: The TfR/F ratio and ferritin showed significant association with IACC. Multivariate analysis confirmed that the correlation of TfR/F with IACC is independent of traditional risk factors of atherosclerosis. The TfR/F ratio correlated with other indicators of atherosclerotic process fibrinogen, sCD163 and interleukin-8. Men with the highest monocyte transferrin receptor expression showed significantly higher values of carotid artery compliance and lower values of beta stiffness index as well as E-selectin in comparison with men with the lowest monocyte transferrin receptor expressions. Moreover, there was a positive association between monocyte transferrin receptor expression and carotid artery compliance.

Conclusions: Our study showed a clear association of body iron stores expressed by the TfR/F ratio with asymptomatic carotid atherosclerosis. TfR/F further exhibited an independent negative correlation with fibrinogen and a positive correlation with sCD163 and IL-8. Moreover, we found a positive association between monocyte transferrin receptor expression and carotid artery compliance.

OBSAH:

1. ÚVOD	10
1.1. Metabolismus železa	10
1.1.1. Absorpce železa a regulace příjmu železa	10
1.1.2. Transport železa v organismu a jeho fyziologické hodnoty v séru	13
1.1.3. Posttranskripční regulace genové exprese a hepcidin	15
1.1.4. Metabolismus železa v játrech, kostní dřeni a retikuloendoteliálním systému	20
1.1.5. Nedostatek železa a přetížení organismu železem	23
1.1.6. Železo a zánětlivá odpověď	24
1.1.7. Železo a oxidační stres	26
1.1.8. Železo a inzulínová rezistence	28
1.2. Ateroskleróza	31
1.3. Železo jako rizikový faktor aterosklerózy	37
2. VLASTNÍ PRÁCE	41
2.1. Pilotní studie – Endogenní zásoby železa a endotelová dysfunkce	41
2.2. Hypotézy	50
2.2.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence	50
2.2.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické poškození karotických tepen	51
2.3. Pacienti a metody	52
2.3.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence	52
2.3.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické poškození karotických tepen	53
2.4. Výsledky	56
2.4.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence	56
2.4.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické poškození karotických tepen	64
2.5. Diskuze	70
2.5.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence	70
2.5.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické poškození karotických tepen	72
2.6. Závěr	75
3. POUŽITÁ LITERATURA	77
4. SEZNAM PUBLIKACÍ	92
5. SEZNAM ZKRATEK	94

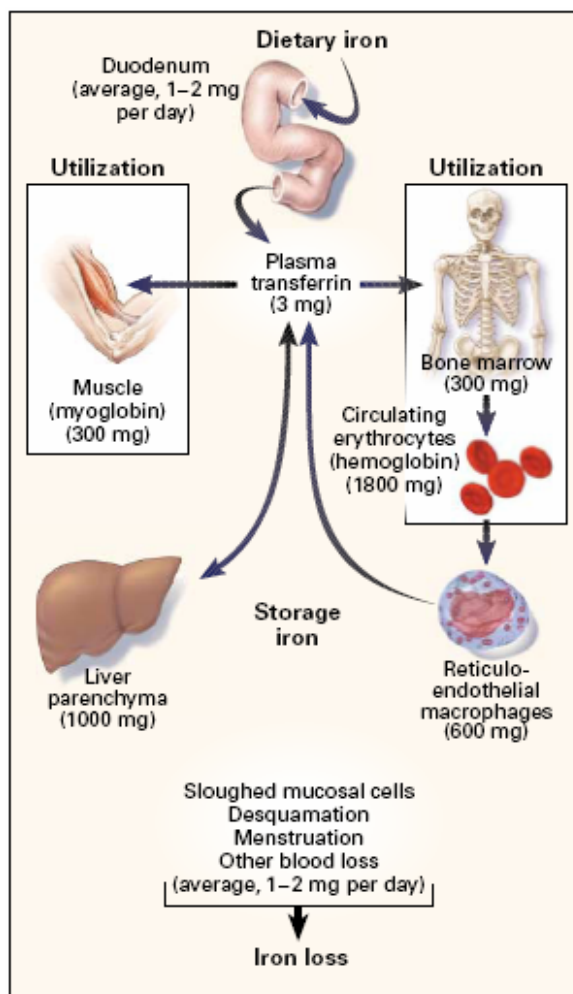
1. ÚVOD

1.1. METABOLIZMUS ŽELEZA

Jako biogenní prvek se železo vyskytuje ve 2 oxidačních formách Fe^{2+} a Fe^{3+} . Tato vlastnost ho činí nepostradatelným v řadě základních biologických funkcí. Je esenciální komponentou hemoglobinu a myoglobinu a má proto nezastupitelnou funkci v přenosu kyslíku. Jako kofaktor enzymů oxidáz peroxidáz, hydroxyláz, kataláz a ribonukleotidreduktázy ovlivňuje metabolismus kyslíku a proliferaci buněk. Podílí se na přenosu kyslíku v organizmu, elektronovém transportu v dýchacím řetězci, syntéze ATP, syntéze DNA i RNA. Jeho přítomnost je nezbytná pro regulaci buněčného cyklu (přechod z fáze G1 do fáze S) a expresi regulačních proteinů p53, p21, které zastavují buněčný cyklus v případě poškození DNA. Účastní se také imunitní odpovědi organizmu. Intracelulární působení železa je nezbytné pro správnou baktericidní funkci makrofágů, protože přispívá k produkci toxických kyslíkových radikálů, a tím i k nitrobuněčné destrukci některých fagocytovaných organismů. Identickým působením však může být železo pro organizmus toxické. Nenavázané železo má schopnost katalyzovat tvorbu volných kyslíkových radikálů, které poškozují esenciální biologické komponenty lipidy, proteiny i DNA. Vzhledem k potenciální toxicitě musí proto organizmus příjem železa pečlivě regulovat. Tělo dospělého člověka obsahuje 45 - 55 mg železa na kg tělesné hmotnosti. Ženy ve fertilním věku mají endogenní zásoby železa nižší v důsledku pravidelných ztrát menstruací. Denní ztráty činí cca 0,03 % tj. 1 mg železa/den (deskvamace buněk sliznice gastrointestinálního traktu, kůže, ztráty žlučí, krvácení). Ekvivalentní množství musí být doplněno příjmem potravy. Ferro-forma (dvojmocná) je charakteristická pro železo hemové, zatímco skladovací a transportní proteiny vážou železo ve ferri-formě (trojmocné). Železo je v organizmu rozloženo tak, že cca 70 % je vázáno na hemoglobin cirkulujících erytrocytů, 20 - 30 % se vyskytuje jako zásobní ve formě feritinu, popř. hemosiderinu, 4 % jsou součástí myoglobinu, 1 % železa je vázáno v enzymech a funkčně významné transportní železo vázané na transferin činí kvantitativně nejmenší podíl tj. 0,1 %. Kromě erytrocytů nacházíme největší obsah železa v hepatocytech a buňkách retikuloendoteliálního systému (*Andrews 1999*).

1.1.1. Absorpce železa a regulace příjmu železa

Průměrný denní příjem železa tvoří 20 mg, z něho se však vstřebá pouze 3 - 6 %. V Severní Americe a v Evropě jsou 2/3 železa v dietě tvořeny ferri formou a 1/3 jako železo hemové. 2/3 z celkového množství absorbovaného železa však tvoří právě železo hemové, protože většina nehemového železa přijímaného v potravě se uvnitř střevního lumen váže na cheláty, a tak se stává nedostupným pro absorpci (*Conrad 2001*).



Metabolizmus železa

Andrews NC: Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med* 1999, 341(26): 1986-1995

V kyselém prostředí žaludku se většina železitých sloučenin potravy štěpí a poskytuje Fe^{3+} ionty, které mohou redukovat látky v potravě (např. kyselina askorbová). Příjem železa probíhá v duodenu a v proximálním jejunu. Zahrnuje absorpci železa z lumen střeva apikální membránou enterocyty, průchod cytoplasmou (případně uložení ve formě feritinu) a uvolnění do krevního oběhu přes bazolaterální membránu.

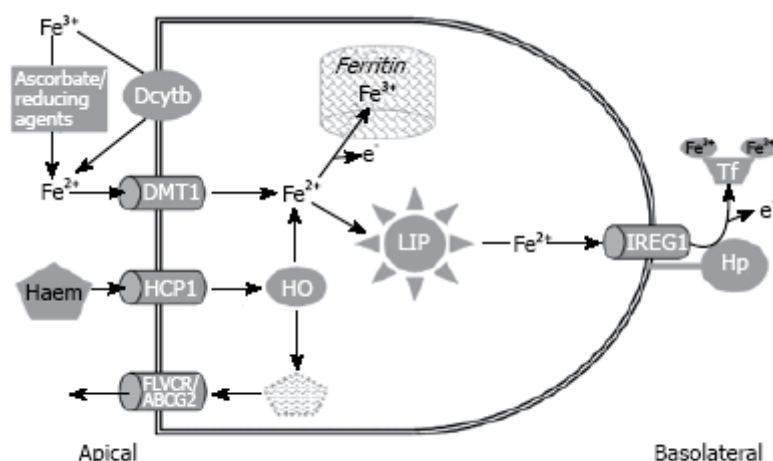
Absorpce hemového železa je efektivnější v porovnání s nehemovým. Proteolytickým štěpením se z hemoglobinu a myoglobinu uvolňuje hem, který prochází neporušeně přes membránu enterocyty jako metaloporfyrin. Byl objeven i intestinální transportér pro hem pojmenovaný HCP1 (hem carrier protein 1) (Shayeghi 2005). Vazebná aktivita tohoto přenašeče pro hem je nejvyšší v duodenu a klesá distálním směrem. Uvnitř buňky je železo z metaloporfyrinu uvolněno pomocí enzymu hemoxygenasy (HO), odštěpený bilirubin je odstraňován z buňky efluxem proteiny FLVCR (feline leukaemia virus C receptor) a ABCG2 (ATP-binding cassette protein). Dále se hemové železo ukládá v buňce nebo je uvolněno stejnou cestou jako železo nehemové. V potravě se nehemové železo vyskytuje převážně ve ferri-formě. K jeho průchodu přes apikální membránu enterocyty je

potřeba redukce z Fe^{3+} na Fe^{2+} , kterou zajišťuje membránová reduktáza Dcytb (duodenal cytochrome b). Podobně mohou železo redukovat i některé složky potravy jako kyselina askorbová, cystein nebo histidin. Vlastním transportérem je membránový protein DMT-1 (divalent metal transporter, synonyma DCT-1, Nramp2), který se nachází v kartáčovém lemu enterocytů a v endosomech somatických buněk. DMT-1 transportuje železo v symportu s protony a vyžaduje pro správnou činnost pH gradient (minimálně pH 6 vs. pH 7,4) (Fuchs 2004). Transport nehemového železa přes membránu enterocytu se může odehrávat i ve ferri-formě navázané na mucin žaludku, který sehraává úlohu chelátu a umožňuje absorpci železa cestou integrinu-mobilferinu-paraferitinu (Conrad 1992). Celý komplex funguje jako reduktáza měnící Fe^{3+} na Fe^{2+} .

Po absorpci vytváří železo uvnitř cytosolu enterocytu labilní intracelulární pool (LIP) – tj. přibližně 3 - 5 % z celkového železa v buňce. Jde o metabolicky a katalyticky reaktivní železo vázané na cheláty o nízké molekulární hmotnosti - polykarboxylové kyseliny (např. citrát), fosfáty (ADP a ATP), fosfolipidy, nukleosidy a další. Skládá se z obou forem železa (Fe^{3+} a Fe^{2+}). Železo v LIP je rychle využitelné pro potřeby buňky na rozdíl od transportní a zásobní formy. Pro využití LIP je důležité právě udržení železa ve dvojmocné formě. Přeměna Fe^{3+} na Fe^{2+} se děje intracelulárně působením glutathionu, askorbátu, NADPH, ferredoxinu, beta-ketokyselin a thioredoxinu. Železo v LIP reguluje také vazbu IRP na IRE klíčových genů pro transport a ukládání železa v buňce. Většina železa je z enterocytu uvolněna do krevního oběhu (Pácal 2004). Železo Fe^{2+} (obsažené v LIP) se váže na membránový protein feroportin (synonyma Ireg1 – iron-regulated transporter, MTP 1), který umožňuje eflux Fe^{2+} přes bazolaterální membránu. Před vazbou železa na transportní protein transferin musí dojít k reoxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , kterou zajišťuje hephaestin, homolog ceruloplazminu (sérový protein s ferroxidázovou aktivitou). Jedna molekula transferinu váže 2 ionty Fe^{3+} . Chelatace vazbou na transferin udržuje železo v rozpustné formě, předchází tvorbě toxických kyslíkových radikálů a umožňuje jeho transport do buněk. Celkové množství plazmatického transferinu reprezentuje celkovou vazebnou kapacitu plazmy pro železo. Za fyziologických podmínek je transferin nasycen ze 30 % (saturace transferinu).

Intracelulární feritin váže železo a chrání tak buňku proti jeho toxickým účinkům. Jeho množství je v rovnováze s obsahem železa v labilním intracelulárním poolu (LIP). Pokud jsou vysoké endogenní zásoby železa v organismu, železo vstřebané do enterocytu zůstává vázané na intracelulární feritin, nevstřebává se a vylučuje se z organismu při zániku enterocytu. Pokles železa v LIP vede ke snaze buňky o jeho zvýšení uvolněním Fe z feritinu a tím i k poklesu množství intracelulárního feritinu. Zrcadlový obraz nastává při nadbytku železa v LIP (Kruzsewski 2004).

Regulace intestinální absorpce železa je klíčová, neboť jeho ztráty organismem za fyziologických okolností jsou minimální. Systémové signály primárně ovlivňují expresi feroportinu na bazolaterální membráně enterocytu, zvýšení exprese feroportinu vede ke snížení intracelulárních zásob železa a labilního intracelulárního poolu. Sekundárně to má za následek i zvýšení transportérů na apikální membráně enterocytu.



Intestinální absorpce železa

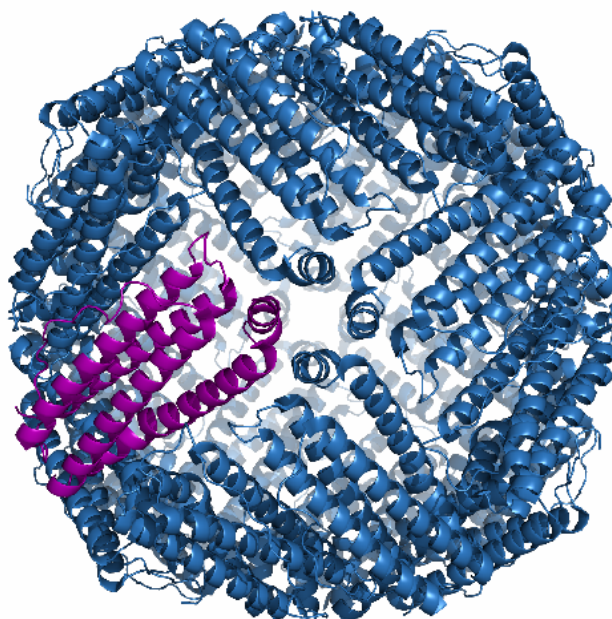
Sharp P, Srai SK. The molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Gastroenterol* 2007; 13(35): 4716-4724

1.1.2. Transport železa v organismu a jeho fyziologické hodnoty v séru

Transport železa od enterocytů k ostatním buňkám se děje prostřednictvím transferinu. Apo-transferin je jednořetězcový sérový polypeptid (β 1-globulin) s dvěma vazebnými místy pro Fe^{3+} . Jeho molekulární hmotnost činí 80 kD. Vazba železa je reverzibilní. Saturace transferinu je za normálních podmínek kolem 35 % (poměr diferického a monofेरického transferinu je přibližně 1:2). Při poklesu saturace pod 16 % (při sideropenické anémii) jde zjevně o nedostatek železa pro erythropoézu a je nutné zahájit substituční léčbu. Koncentrace transferinu se v plazmě dospělého člověka pohybuje mezi 2,0 - 3,7 g/l. Hlavním místem syntézy transferinu jsou játra. Obrát železa přenášeného transferinem je 25 mg/24 hod a cca 80 % železa je transportováno do kostní dřeně pro erythropoetické buňky k syntéze hemoglobinu. Poločas transferinu je 8 - 10 dnů. U sideropenické anémie se hodnota transferinu v plazmě zvyšuje (stimulovaná syntéza v játrech), u anémie chronických chorob je naopak nižší. Každá molekula transferinu může vázat až 2 ionty Fe^{3+} . To odpovídá 1,4 mg neboli 25,1 μmol železa na gram transferinu. TIBC vyjadřuje stejné údaje jako saturace transferinu, i když vyjádřeno číselně, jsou údaje reciproční. Při poklesu saturace transferinu stoupá TIBC. Při nedostatku železa stoupá plazmatická koncentrace transferinu a jeho saturace železem klesá (tzn. jeho vazebná kapacita pro železo stoupá). Naopak při přetížení organismu železem koncentrace transferinu v plazmě klesá a jeho nasycení naopak vzrůstá (klesá vazebná kapacita pro železo). Vyšetření cirkulujících transferinových receptorů je nejpřesnějším ukazatelem sideremie. Hladina cirkulujících transferinových receptorů je přímo úměrná jejich počtu na povrchu buněk. Při nedostatku železa se se zvýšenou tvorbou transferinu zvyšuje i počet receptorů. Při přetížení organismu železem naopak počet cirkulujících transferinových receptorů klesá. Samotná hodnota plazmatického železa 6,7 - 28,3 $\mu\text{mol/l}$ nevypovídá dostatečně

o skutečném stavu železa v organismu. Zásobní železo je uloženo v makrofázích sleziny, v játrech a v kostní dřeni. Hlavní zásobní formou železa je v přírodě velmi rozšířená bílkovina feritin. Objevitelem molekuly feritinu je český akademik Vilém Laufberger. O průkazu feritinu referoval na XV. mezinárodním sjezdu fyziologů v roce 1935 v Petrohradu. V době, kdy začal pracovat na izolaci feritinu, bylo teprve jen málo živočišných bílkovin připraveno v čistém krystalickém stavu (hemoglobin, plazmatický albumin a několik málo trávicích enzymů). O feritinu přesvědčil Laufberger definitivně vědecký svět tehdy, když se mu podařila jeho krystalizace, o níž podal zprávu XVI. mezinárodnímu sjezdu fyziologů v Curychu v roce 1938. Koncentrace feritinu v plazmě odráží množství zásob železa v organismu. Jedná se o protein o molekulární hmotnosti 450 kD, složený z 24 podjednotek dvou typů H a L. Uvnitř své molekuly váže trojmocné železo – ferri-oxyhydroxid (až 4500 atomů železa na 1 molekulu feritinu). Feritin slouží nejen jako zásoba železa, ale chrání intracelulární prostředí proti toxickému účinku volných iontů železa. Sérový feritin pochází hlavně z buněk monocyto-makrofágového systému. Vysoce toxické volné železo je skladováním v molekule feritinu neutralizováno. Těžký řetězec v molekule apoferitinu vykazuje ferroxidázovou aktivitu a katalyzuje oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , a tak zamezuje železem katalyzovaným redoxním reakcím, které by mohly vést k oxidačnímu stresu. Aby bylo volné železo z feritinu získáno, jsou zapotřebí sloučeniny, které mají schopnost redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Tuto roli mohou plnit např. aniontový superoxidový radikál, dihydroflaviny, askorbát nebo thioly. Uvolnění železa pak může vést ke zvýšení tvorby volných kyslíkových radikálů. Feritin je současně proteinem akutní fáze, takže pokud jsou jeho hodnoty zvýšeny nad normu (muži 30 - 300 ng/ml, ženy 12 - 125 ng/ml) je nutné vyloučit zánět v organismu. Kromě toho se zvyšuje i u řady maligních onemocnění. Tyto souvislosti je potřeba respektovat při hodnocení kauzálního vztahu zásob železa a aterosklerózy. Expresi genu H řetězce feritinu stimulují cytokiny TNF- α , IFN γ , IL-1 α a IL-6 (Torti 1988, Rogers 1996). Druhou zásobní formou železa v organismu je hemosiderin, degradovaná molekula feritinu. Při výrazném přetížení organismu železem (opakované krevní transfúze) se granula hemosiderinu nacházejí ve zvýšené míře v makrofázích a některých parenchymatózních buňkách, zejména v játrech. Hemopexin je β -globulin, jednořetězcový polypeptid o molekulové hmotnosti 70 kD, syntetizovaný v játrech s denní obměnou 50 %. Nejde o bílkovinu akutní fáze. S velkou afinitou se váže na volný hem v plazmě a vzniklý komplex je pak metabolizován v hepatocytu. Norma 500 - 1000 ng/ml plazmy. Jeho hladiny jsou nízké u hemolytické anemie, vysoké naopak u DM, karcinomů, infekcí a revmatoidní artritidy. Haptoglobiny jsou α -globuliny syntetizované v játrech s denní obměnou podobně jako hemopexin 50 %. Geneticky se mohou vyskytovat ve 3 formách. Normální hodnoty jsou interindividuálně velmi variabilní 0,3 - 1,9 g/l, u jednotlivce jsou však konstantní. Nízké hladiny nacházíme při hemolýze, infekcí, akutní pankreatitidy. Zvýšení u nádorových onemocnění, autoimunitních chorob, traumat a operací. Normálně je do plazmy uvolňováno 0,7 g volného hemoglobinu a k jeho eliminaci je potřeba přibližně 1 g haptoglobinu. Malá část erytrocytů zaniká fyziologicky intravaskulárně (cca 10 - 20 %) za normálních okolností je v plazmě volného hemoglobinu méně než 10 mg/l, zvyšuje se při vyčerpání vazebné kapacity haptoglobinu. Volný cirkulující hemoglobin je z plazmy eliminován několika způsoby. Jednak vazbou na haptoglobiny, které v 1 l plazmy váží 1 - 1,4 g volného he-

moglobinu. Tento komplex je pak vychytáván buňkami retikuloendoteliálního systému (makrofágy) s kapacitou odsunu 150 mg Hgb/l plazmy. Volný hemoglobin se dále váže v plazmě na hemopexin a tento komplex je metabolizován v jaterním parenchymu. Při vysycení haptoglobin-hemopexinového systému je volný hemoglobin oxidován na methemoglobin a následně se váže na albumin. Po vyčerpání vazebné kapacity albuminu (1 molekula albuminu váže 2 molekuly methemoglobinu) se volný hemoglobin dostává do ledvin, kde je cca 1/3 reabsorbována renálními tubuly, část železa se vrací kapilárami zpět do krve, část zůstává ve formě hemosiderinu v buňkách renálních tubulů a s jejich deskvamací se objevuje hemosiderin v moči. Volný hemoglobin v moči se objevuje, pokud jeho plazmatická koncentrace převyšuje 300 mg/l plazmy (např. hemolytická anémie).



Molekula feritinu

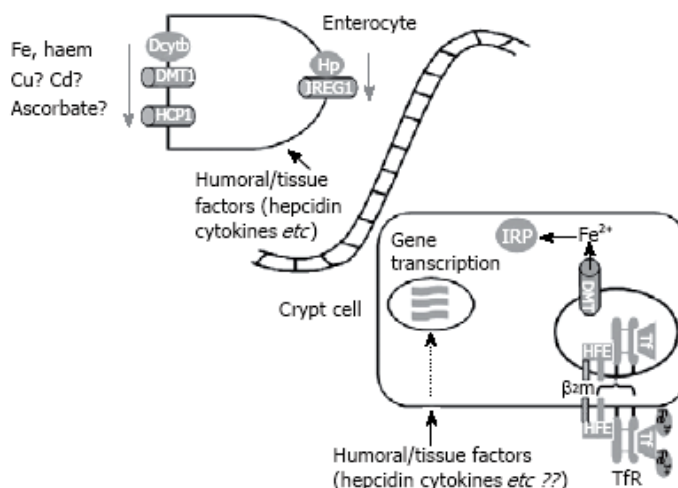
Granier T, Langlois D'Estaintot B, Gallois B, Chevalier JM, Precigoux G, Santambrogio P, Arosio P: Structural description of the active sites of mouse L-chain ferritin at 1.2 Å resolution. *J Biol Inorg Chem* 2003, 8:105-111.

1.1.3. Posttranskripční regulace genové exprese a hepcidin

Důležitým mechanismem homeostázy železa je posttranskripční regulace genové exprese v závislosti na hladině železa v buňce. Regulace se uskutečňuje interakcí mRNA se specifickými proteiny IRP (iron regulatory proteins, IRP 1 a IRP 2). IRP fungují jako cytoplazmatické „senzory“ labilního intracelulárního poolu železa, rozpoznávají a specificky se váží na IRE (iron responsive elements). IRE jsou 5' nebo 3' nepřepisovatelné oblasti mRNA (UTR – untranslated regions), které mají vlásenkovou strukturu se smyčkou. Smyčku IRE tvoří sekvence 5'-CAGUGX-3', kde X je obvykle U nebo C. Ve vlásence je výduť s nepárovým cytozinem, který je klíčovou determinantou správné funkce IRE. IRE byly nalezeny na nepřepisovaných oblastech mRNA pro feritin (5' UTR), feroportin (5' UTR), transferinový receptor (3' UTR) a DMT-1 (3' UTR).

Nízká hladina železa v buňce umožní vazbu IRP na IRE. Interakce IRP s 3'-IRE (transferinový receptor, DMT-1) má za následek zvýšení stability mRNA. Ta pak není štěpena mRNA endonukleázou a výsledkem je translace TfR a DMT-1. To vede ke zvýšené absorpci železa. Vazba IRP na 5'-IRE brání translaci mRNA a má za následek snížení tvorby feritinu.

Při nadbytku železa je IRP 1 přeměněn na cytosolovou akonitázu a IRP 2 odbourán. Nemohou se tak vázat na IRE. 3'-mRNA je štěpena, nesyntetizují se TfR ani DMT-1. IRE 5'-mRNA se naopak stabilizuje a zvyšuje se tak translace feritinu. Ukládání železa převyší jeho přísun. U feroportinu se kromě posttranskripční regulace genové exprese významně uplatňuje postranlační regulace pomocí hepcidinu (viz dále). IRE je také přítomen na nepřepisovaných oblastech 5' UTR mRNA pro syntázu 5-aminolevulové kyseliny v erythropoetických buňkách (první enzym v biosyntéze hemu). Syntéza hemoglobinu je tak regulována podle dostupnosti železa v organismu (Ponka 2003).

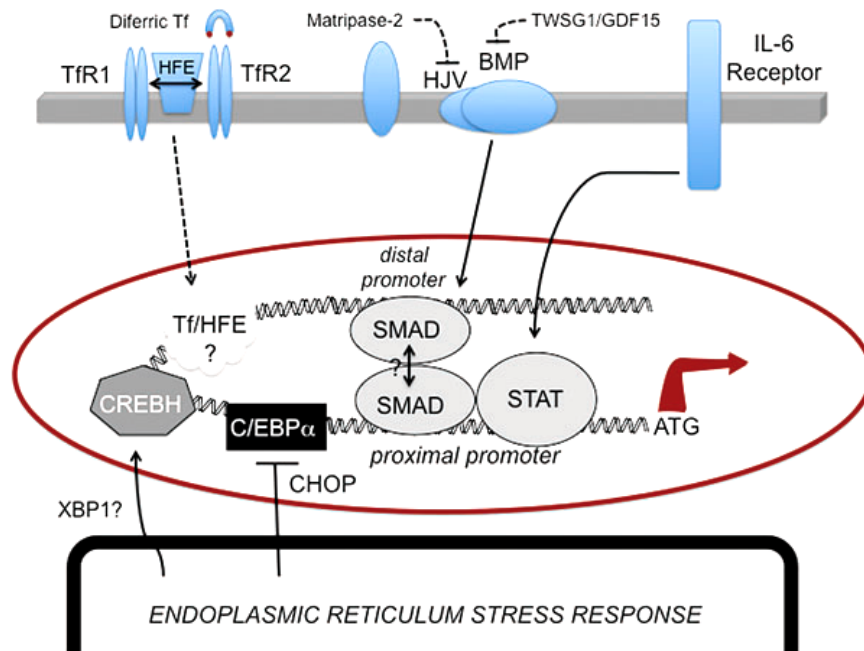


Regulace intestinálního transportu železa

Sharp P, Srai SK. The molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Gastroenterol* 2007; 13 (35): 4716-4724

Hepcidin (Hepatic bactericidal protein) byl primárně objeven jako antimikrobiální peptid, kódovaný HAMP genem, lokalizovaném na chromozómu 19. Jedná se o hormon syntetizovaný hepatocyty z pre-prohepcidinu a prohepcidinu podle aktuální potřeby železa v organismu. Jeho objev změnil pohled na homeostázu železa. Funguje jako negativní regulátor uvolňování absorbovaného železa z enterocytů duodena a recyklovaného železa z makrofágů. Export železa z enterocytu a makrofágu inhibuje cestou feroportinu. Indukuje internalizaci feroportinu do enterocytu s jeho následnou degradací v endolysosomech (Nemeth 2004). Jsou-li endogenní zásoby železa v organismu nízké, je produkce hepcidinu snížena a feroportin je zvýšeně expromován na bazolaterální membráně enterocytu. Zvýšená produkce hepcidinu má za následek pokles plazmatické koncentrace železa, retenci železa v buňkách RES a snížení absorpce Fe z potravy. Hladina hepcidinu je regulována koncentrací železa v hepatocytu, stoupá při zánětu (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) a je ovlivňována po-

třebou erythropoézy a hypoxií. Nízké hladiny hepcidinu tedy nacházíme při nedostatku železa, hypoxii a hemochromatóze (kromě typu 4). Zvýšená exprese hepcidinu při zánětu a infekci je přínosná pro organismus, protože sekvestrace železa do zásobní formy v buňkách vede k jeho nižší dostupnosti pro invadující organismus (patogeny potřebují železo pro ribonukleotidreduktázu k syntéze DNA). Na druhou stranu vede k rozvoji anémie při zánětu v důsledku excesivní syntézy hepcidinu. Tento patologický stav však nacházíme nejen u infekce, ale i celé řady autoimunitních onemocnění, malignit i rejekce po transplantaci (*Atanasiu 2006*). Zánětlivý proces vede ke snížení saturace transferinu a snížení erythropoézy. Skutečné mechanismy, kterými získává organismus informace o aktuálním stavu železa a reguluje expresi hepcidinu v hepatocytech, jsou známy zatím jen zčásti. U některých patologických stavů, jako jsou např. talasémie a kongenitální dyserythropoetická anémie, je neefektivní erythropoéza doprovázena vysokou hladinou železa v plazmě a jeho ukládáním v parenchymálních tkáních. Zjistilo se, že hladina hepcidinu je u těchto pacientů nízká až nedetekovatelná, což naznačuje, že signály přicházející od erytroidních buněk jsou nadřazeny signálům informujícím o stavu železa v organismu. Výsledkem je snížení hladiny hepcidinu a zvýšená absorpce železa navzdory jeho masivním zásobám v organismu (*Papanikolaou 2005*). U talasemických syndromů bylo prokázáno, že těmito erytroidními supresory by mohly být růstový diferenciační faktor 15 (GDF15, differentiation factor 15) (*Tanno 2007*) a molekula nazvaná „twisted gastrulation“ (TWSG1) (*Tanno 2009*). Na základě analýzy myších modelů a studií u lidí postižených různými formami hemochromatózy se předpokládá, že v hepatocytech jater funguje komplex proteinů, které společně nebo nezávisle regulují syntézu hepcidinu. Součástí tohoto komplexu jsou následující proteiny: transferinový receptor 2 (TFR2); protein asociovaný s hemochromatózou typu I (HFE) a hemojuvelin (HJV). Membránově-asociovaná forma HJV (mHJV) společně s proteinem BMP6 (z angl. „bone morphogenetic protein 6“) aktivuje BMP signální dráhu (*Andriopoulos 2009*) a prostřednictvím komplexu SMAD1/5/8 s transkripčním faktorem SMAD4 (*Wang 2005*) přímo stimuluje genovou expresi hepcidinu. Se stoupající saturací TF železem také pozitivně koreluje aktivita HFE a TFR2 ve smyslu stimulace exprese hepcidinu. Předmětem intenzivního výzkumu je skutečnost, zda HFE a TFR2 také využívají BMP6/SMAD signální dráhu nebo ovlivňují syntézu hepcidinu nezávisle na ní. Dalším proteinem, který reguluje expresi hepcidinu, je transmembránová serinová proteáza neboli matriptáza 2. Matriptáza 2, kódovaná genem *TMPRSS6* (type II transmembrane serine protease 6) (*Du 2008*) je negativním regulátorem exprese hepcidinu. Inaktivační homozygotní mutace *Tmprss6* u myší (tzv. „Mask mice“) je spojena s velmi vysokou hladinou hepcidinu, která způsobuje systémový nedostatek železa a vede k rozvoji těžké mikrocytární anémie. Předpokládá se, že matriptáza 2 přímo štěpí mHJV a inaktivuje tak BMP6/SMAD signální dráhu (*Silvestrii 2008*). Exprese hepcidinu je kromě hladiny železa regulována i zánětlivými procesy různého původu (bakteriální infekce, chronická, autoimunitní či nádorová onemocnění), které vedou ke zvýšené produkci cytokinů.



Regulátory syntézy hepcidinu během zánětu

Wessling-Resnick M. Iron Homeostasis and the Inflammatory Response.
Annu Rev Nutr 2010, 30: 105–22

Hladiny hepcidinu klesají v odpovědi na hypoxii (Nicolas 2002). Hypoxií-inducibilní faktory jsou transkripční faktory regulované hydroxylací a podjednotky, která řídí jejich degradaci. Tato modifikace zahrnuje prolyl-hydroxylázy, které pro svou funkci vyžadují kyslík a železo. HIFα podjednotky jsou proto stabilní za současné hypoxie nebo při nízké hladině železa. HIFs jsou důležitými regulátory řady genů zahrnutých do homeostázy železa a zánětu včetně TfR1, hem-oxygenázy-1, natural resistance-associated macrophage proteinu 1 (Nramp1), DMT1, erythropoetinu, Dcytb a feroportinu. Nicméně přesný mechanismus regulace hepcidinu prostřednictvím HIFs zůstává zatím kontroverzní a vyžaduje další výzkum. HIFα je také transkripčně regulovaný imunoregulátorem NF-κB (Rius 2008).

Dalším transkripčním regulátorem syntézy hepcidinu je C/EBPα (CCAAT/enhancer-binding protein) (Courselaud 2002), který pravděpodobně moduluje syntézu hepcidinu v souvislosti se signalizací erythropoetinu a zvýšenou erythropoézou (Pinto 2008). CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein) je inhibítoem C/EBPα (Oliveira 2009). Stres asociovaný s deficitem hemu aktivuje hemem regulovaný inhibitor (HRI), který blokuje syntézu globinu u některých typů anémie (Chen 2007). HRI je exprimován zejména u erytroidních prekurzorů, ale uplatňuje se i v makrofázích recyklujících železo a v homeostáze železa. Ztráta aktivity HRI je asociovaná s redukcí zánětlivé odpovědi a nižší hladinou hepcidinu po stimulaci lipopolysacharidem (Liu 2007).

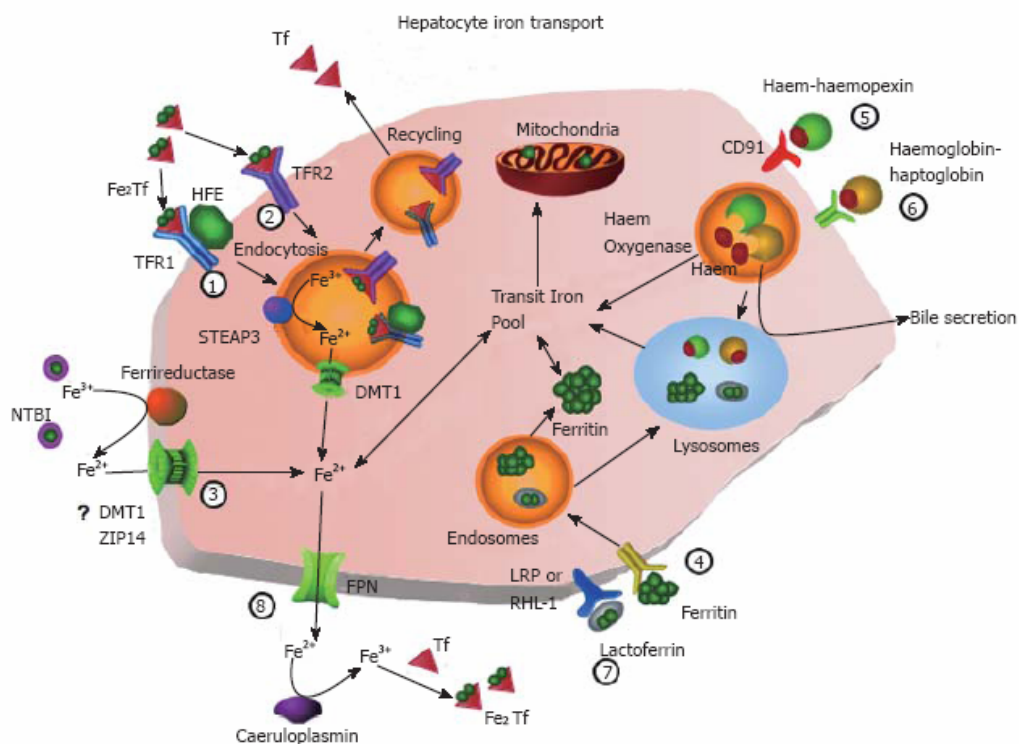
Hereditární hemochromatóza je onemocnění charakteristické zvýšenou absorpcí železa v duodenu. Je asociované s mutacemi v genech zahrnutých v regulaci exprese hepcidinu (HFE, TFR2 a HJV), v hepcidinu samotném a ve feroportinu, který je terčem působení hepcidinu. Hemochromatóza typu 1 (mutace v HFE) (Feder 1996) a 3 (mutace v TFR2) (Camaschella 2000) a juvenilní hemochromatóza (neboli typ 2; mutace v HJV a hepcidinu) (Papanikolaou 2004, Roetto 2003) vykazují autosomálně recesivní dědičnost. Pacienti mají nedetekovatelné nebo vzhledem k přetížení železem neadekvátně nízké hladiny hepcidinu, což vede k nadměrnému uvolňování železa z enterocytů a makrofágů. Nejčastější mutace způsobující hereditární hemochromatózu je substituce C282Y v proteinu HFE, která brání jeho umístění na membráně buněk a vede k jeho degradaci. HFE gen je lokalizovaný na 6. chromozómu a jeho produkt HFE protein. HFE protein je homologní s MHC glykoproteiny I. třídy. Na rozdíl od nich však nemůže vázat endogenní peptidy v důsledku přemístění domén. Po spojení s β 2-mikroglobulinem je distribuován do plazmatické membrány (β 2 mikroglobulin je nutný k transportu HFE na povrch buňky). Exprese HFE proteinu je nejvyšší v játrech a na bazolaterální membráně buněk střevních krypt. HFE protein má schopnost vazby na TfR 1, se kterým vytváří komplex a kompetuje tak o vazebné místo transferinu (Feder 1998). Transferin nesoucí železo uvolňuje z vazby na TfR HFE protein, který funguje jako senzor pro saturaci transferinu a regulátor exprese hepcidinu v hepatocytu. Zvýšená saturace transferinu se odrazí v jeho vazbě na TfR hepatocytů. To vede k uvolnění HFE proteinu z vazby na komplex, syntéze hepcidinu a následnému naprogramování enterocytů na příjem menšího množství železa ze střeva. Zrcadlová situace nastává při nedostatku železa. Ztráta funkce HFE proteinu u hemochromatózy vede k depleci hepcidinu a zvýšené expresi proteinů zahrnutých do absorpce železa především feroportinu 1 a sekundárně i DMT-1. To má za následek zvýšený příjem železa enterocyty a jeho akumulaci v organismu. Exprese TfR 2 na hepatocytech korelovala pozitivně se saturací transferinu (Robb 2004). To vedlo k hypotéze o dalším možném mechanismu regulace syntézy hepcidinu prostřednictvím TfR 2. Snížení syntézy hepcidinu hepatocytem může indukovat i zmiňovaný solubilní hemojuvelin, uvolňovaný z kosterního svalu, pomocí vazby na transmembránový neogeninový receptor hepatocytu. Mutace HFE2 genu (kódujícího hemojuvelin) způsobuje juvenilní hemochromatózu (Swinkels 2006). U hemochromatózy typu 4, označované i jako choroba feroportinu („ferroportin disease“) vykazují příčinné mutace autosomálně dominantní dědičnost, pacienti jsou heterozygoti (Montosi 2001). Na rozdíl od předchozích typů mají pacienti s hemochromatózou typu 4 zvýšenou hladinu hepcidinu (Papanikolaou 2005). Příčinné mutace jsou dvojího typu a vedou proto i k různým fenotypovým projevům, podobným nebo odlišným od klasické hemochromatózy. První typ mutací způsobuje rezistenci feroportinu na negativní regulaci a vede k fenotypu podobnému klasické hemochromatóze, protože obdobně dochází k masivnímu uvolňování železa do oběhu. Druhý typ mutací má za následek nesprávnou membránovou lokalizaci feroportinu, a tedy i ztrátu schopnosti transportovat ionty železa; železo se hromadí v makrofázích. U některých pacientů se proto může vyvinout anémie v důsledku nedostatečnosti železa pro erytroidní buňky.

1.1.4. Metabolismus železa v játrech, kostní dřeni a RES

Hepatocyty slouží jako zásobárna železa. Přijímají železo z portální krve a vzroste-li jeho potřeba v organizmu, uvolňují ho do oběhu. Stejně jako v makrofágu je železo ukládáno v hepatocytu ve formě feritinu nebo hemosiderinu. Expres transferinového receptoru (TfR1) je regulována železem prostřednictvím posttranskripčního mechanismu přes 5' IRE (iron responsive element). Při nedostatku železa se IRP (iron regulatory proteins) váží na IRE a prodlužuje poločas mRNA a tak zvyšují translaci TfR1. Při nadbytku železa se IRP neváží na IRE, snižuje se stabilita mRNA a klesá i syntéza TfR1. Gen pro TfR1 obsahuje ve svém promotoru tzv. „hypoxia response element“, který vede k zvýšené regulaci transkripce v přítomnosti hypoxie-inducibilního faktoru. Transkripce se rovněž zvyšuje vlivem cytokinů (IL-2), mitogenů a růstových faktorů. TfR2 má nižší afinitu k transferinu v porovnání s TfR1 a uplatňuje se pravděpodobně při vysokých koncentracích transferinu v plazmě, kdy je saturován TfR1. HFE – hemochromatosis protein interaguje s helikální doménou TfR1 a kompetuje o vazebné místo s transferinem. Je regulačním proteinem pro příjem železa prostřednictvím transferinu a TfR1. Výsledná inhibice způsobí redukcí příjmu železa v řadě různých typů buněk. Mutace v HFE byla první popsanou příčinou hemochromatózy. STEAP3-ferireduktáza (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) – redukuje železo následně po endocytóze a acidifikaci vezikulu na ferro-formu před jeho průchodem přes endosomální membránu. Předpokládá se, že železo je redukováno ještě před jeho uvolněním z vazby na transferin. V případě potřeby je pak Fe^{2+} exportováno z buňky ferioportinem a následně oxidováno ceruloplazminem na Fe^{3+} před vazbou na transferin. Játra jsou také místem syntézy hepcidinu. Produkce hepcidinu a jeho hladina negativně koreluje s erythropoetickou aktivitou kostní dřene. Anémie (navozená odběrem krve) způsobí dramatický pokles v hladinách mRNA pro hepcidin. Hladiny mRNA pro hepcidin se však nemění po venepunkci v okamžiku, kdy se podají před odběrem inhibitory erythropoézy nebo protilátky proti erythropoetinu (Pak 2006). Ve stejné studii autoři vyloučili možnost, že je syntéza hepcidinu přímo regulována erythropoetinem. Nezávisle na tom tým profesora Nečase prokázal, že po ozáření kostní dřene došlo k zvýšení mRNA pro hepcidin v hepatocytech myši předléčených phenylhydrazinem (Nečas 2006).

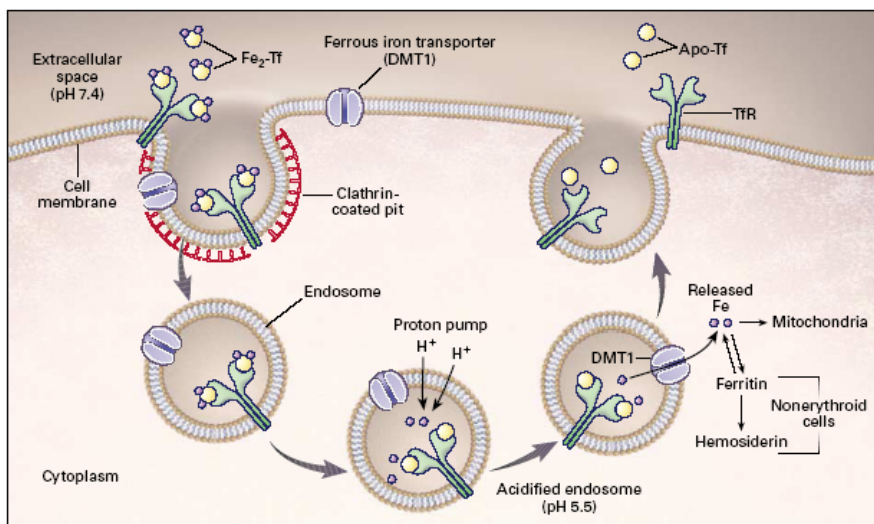
Prekurzory erytrocytů přijímají železo cestou transferinového cyklu. Transferin se váže na transferinový receptor 1 (TfR1) na povrchu buňky. Dojde k endocytóze celého komplexu. V endosomu je protonovou pumpou vytvářeno nízké pH, jehož vlivem se uvolní železo z vazby na transferin. Fe^{3+} je pak redukováno na Fe^{2+} pomocí ferireduktázy STEAP 3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) a následně může být exportováno přes DMT-1 z endosomu do cytoplazmy. Apotransferin (Apo-Tf) i TfR1 se vrací zpět na povrch buňky a dále se účastní na dodávce Fe buňkám. Sec 1511 protein asistuje v transferinovém cyklu a předpokládá se, že dopravuje endosomální vezikuly k mitochondriím a umožňuje tak přímou dodávku železa do těchto organel. Přesná regulace transportu železa do mitochondrie je esenciální pro biosyntézu hemu, produkci hemoglobinu a tvorbu Fe-S cluster-proteinů během vývoje erytrocytu. Železo je do mitochondrie transportováno prostřednictvím proteinu mitoferinu (Shaw 2006). Erythropoetické buňky pravdě-

podobně neobsahují žádné exportní mechanizmy pro železo a prakticky veškeré přijaté železo je tak využito k syntéze hemoglobinu (Andrews 1999).



Transport železa v hepatocytu

Graham RM, Chua ACG, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007; 13(35): 4725-4736



Cyklus transferinu

Andrews NC: Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med* 1999, 341(26): 1986-1995

Retikuloendoteliální systém je složený z monocytů a makrofágů. Monocyty vznikají z progenitorových buněk v kostní dřeni a jsou uvolňovány do krevního oběhu. Po migraci do různých tkání se diferencují v makrofágy. Buňky RES mají v různých tkáních vysoce specializované funkce – imunoregulační, antimikrobiální a protinádorové. Z hlediska metabolismu železa mají nezastupitelnou roli ve fagocytóze stárnoucích erytrocytů. Tuto úlohu za fyziologických podmínek zastávají především makrofágy v červené pulpě sleziny, nicméně po splenektomii mohou být rychle nahrazeny makrofágy jater a kostní dřeni. Staré erytrocyty nesou na svém povrchu antigen SCA (senescent cell antigen), na který se vážou autologní protilátky IgG a označují je pro makrofágy. Po fagocytóze erytrocytu makrofágem dochází ve fagolysosomu k degradaci erytrocytu hydrolytickými enzymy, proteolýze hemoglobinu a uvolnění hemu. Hem je pak odbouráván za pomoci enzymu hemoxygenázy, lokalizované na endoplazmatickém retikulu. Výsledkem štěpení hemu je vznik biliverdinu, oxidu uhelnatého a Fe^{2+} (Ponka 2003). Pomocí elektronové mikroskopie a dvoudimensionální elektroforézy bylo prokázáno, že část membrány fagozomu je odvozena z endoplazmatického retikula (Gagnon 2002). Proto je pravděpodobné, že degradace hemu probíhá za pomoci hemoxygenázy uvnitř endosomu a volné železo je pak transportováno přes DMT-1 do cytoplazmy a LIP. Železo může být v LIP nebo je skladováno intracelulárně ve formě feritinu nebo exportováno ven z buňky feroportinem s následnou oxidací ceruloplazminem na Fe^{3+} a vazbou na transferin. Deficit ceruloplazminu může vést k rozvoji „anémie z nedostatku železa“ navzdory jeho dostatečným zásobám v organismu (Knutson 2003). Biliverdin vzniklý štěpením hemu je konvertován biliverdinreduktázou na bilirubin, který pak může být z makrofágu odstraněn efluxem prostřednictvím proteinů FLVCR a ABCG2. Monocyty a makrofágy nesou exklusivně na své membráně scavengerový receptor pro hemoglobin, molekulu CD163 (Kristiansen 2001). Přibližně 10 - 20 % z celkového počtu všech odbouraných erytrocytů zaniká intravaskulárně a jejich zánik vede k uvolnění hemoglobinu do oběhu, který se rychle váže na haptoglobin. Buňky RES vychytávají pomocí receptoru CD163 komplexy hemoglobin-haptoglobin, dochází k receptorem řízené endocytóze a degradaci komplexu uvnitř buňky. Tento mechanismus se podílí na přísunu železa do buněk RES. Na povrchových membránách buněk RES byly nalezeny i receptory pro hemopexin, ale za fyziologických podmínek mají pro příjem železa zanedbatelný význam. Izolované monocyty exprimují na svém povrchu transferinové receptory (Bjorn-Rasmussen 1985) a jsou schopny přijímat železo vázané na transferin. Při přeměně monocytu na makrofág se významně zvyšuje počet transferinových receptorů na povrchu buňky. Homeostáza železa v makrofágu je regulována mechanismem posttranskripční regulace genové exprese proteiny IRP-1 a IRP-2, které ovlivňují transkripci pro feritin, transferinové receptory a DMT-1. Ze studií *in vitro* je známo, že na rozdíl od ostatních buněk v organismu zvýšená nabídka železa i zvýšený intracelulární obsah železa v makrofágu paradoxně zvyšuje transkripci i translaci transferinového receptoru *in vitro* (Testa 1989). Pravděpodobně je to v důsledku překvapivé aktivace IRP-1 (Testa 1991, Ponka 1999). Monocyty a lymfocyty exprimují také specifické receptory schopné vázat laktoferin, protein vázající železo, který nacházíme v mléce, mucóze a neutrofilních granulech. Laktoferinové receptory jsou přítomny u všech typů lymfocytů a jejich zvýšená exprese je spojena s jejich aktivací. Laktoferin má celou řadu imunoregulačních funkcí, jako jsou produkce

cytokinů, tvorba protilátek, proteinů komplementu a pozitivní ovlivnění funkce NK buněk. Za intracelulární transport železa v buňkách RES jsou zodpovědné dva proteiny z NRAMP rodiny (natural resistance associated macrophage protein) – NRAMP1 (Vidal 1994) a NRAMP2 (Gruenheid 1999). NRAMP2, protein o molekulární hmotnosti 56 kDa, je exprimovaný v makrofágách a monocytech (synonyma DCT-1, DMT-1). Je lokalizovaný na lyzosomech a pozdních endosomech a má schopnost transportovat Fe oběma směry v závislosti na pH (Goswami 2001). NRAMP 1 se uplatňuje v obraně proti intracelulárním patogenům. Transportuje železo do fagozomu obsahujícího bakterii (např. mycobacterium) a brání tak růstu patogena tvorbou volných kyslíkových radikálů. Na druhou stranu může transportovat i železo ven z fagozomu a tak omezovat jeho přísun pro syntézu nukleových kyselin bakterií. Mezi patogenem a napadeným organismem dochází k boji o železo, neboť patogeny potřebují železo pro svou ribonukleotid reduktázu (syntéza DNA) a hostitel zase pro obranné enzymy (syntáza oxidu dusnatého, NADPH oxidáza). NRAMP1 nemá dominantní úlohu v transportu železa z endosomu přijatého erytrofagocytózou nebo transferinovým cyklem. Myši s homozygotní mutací pro NRAMP1 měly normální hematologický nále (Leboeuf 1995). Naproti tomu NRAMP2 hraje klíčovou roli v intracelulárním přesunu železa přijatého buňkou RES. Je exprimován v recyklujících se endosomech a zajišťuje transport Fe uvolněného z transferinu nebo odbouraného z hemoglobinu z endosomu do cytoplazmy. Jeho syntéza je regulována přes IRE podobně jako syntéza transferinového receptoru nebo ferritinu. Podobně jako enterocyty i makrofágy využívají k exportu železa z buňky ferroportin (označovaný i jako IREG1, MTP1, SLC40A1) (Yang 2002).

1.1.5. Nedostatek železa a přetížení organismu železem

Rozdíl v endogenních zásobách železa může být způsoben pravidelnými krevními ztrátami u premenopauzálních žen, dále geneticky (jako např. u hereditární hemochromatózy, beta-thalassemie či porfyria cutanea tarda), dietou (konzumace hemového železa obsaženého v mase) nebo fyzickou aktivitou. **Při nedostatku železa v organismu** (sideropenii) dochází k poruše růstu a proliferace buněk. Příčinami jsou malabsorpce či maldigesce železa (např. při gastritidě, totální nebo parciální gastrektomii, enteropatii např. celiakii nebo Crohnově chorobě), zvýšené ztráty železa (chronické krvácení) a/nebo nedostatečně krytá spotřeba (růst, těhotenství, dieta s nízkým obsahem železa). Klinické příznaky sideropenie (hypochromní mikrocytární anémie) jsou slabost, palpitace a dušnost, z GIT pak gingivitida, glossitida a angulární stomatitida. Syndrom Plummer-Winson sdružuje angulární stomatitidu, hyperkeratózu orální sliznice, atrofii sliznice orofaryngu i jícnu a koilonychii (lžičkovité nehty). Vzácně se připojuje neuropsychiatrická symptomatologie (cefalea, nesoustředěnost, emoční labilita). Laboratorně se projevívá časně prelatentní sideropenií s poklesem hladiny ferritinu pod 16 ng/ml. V další fázi dochází k latentní sideropenii se současným zvýšením plazmatické koncentrace transferinu, jeho vazebné kapacity a cirkulujících transferinových receptorů. Při již manifestní sideropenii se navíc připojuje pokles koncentrace hemoglobinu a počtu erytrocytů. Anémie je zpočátku normocytární, postupně mikrocytární normochromní až mikrocytární hypochromní s přítomností poikilocytů

a s anisocytózou. **Přetížení organismu železem** má příčiny ve zvýšeném parenterálním přívodu železa nebo opakovaných krevních transfúzích, zvýšeném rozpadu erytrocytů (autoimunitní hemolytická anémie, thalasémie a jiné hemoglobinopatie), atransferinémie nebo aceruloplazminémie a porucha regulace střevní absorpce železa enterocyty tenkého střeva – primární (hereditární) hemochromatóza (převážně typ 1 – autozomálně recesivně dědičné onemocnění s prevalencí znaku 1/400). Lehčí formy přetížení organismu železem nacházíme u chronické hepatitidy C, porfyria cutanea tarda a diabetes mellitus 2. typu. Klinické příznaky přetížení železem nacházíme nejčastěji u primární hemochromatózy, u ostatních forem nebývají vyjádřeny. Postižena bývají játra (cirhóza s hepatosplenomegalií), pankreas (diabetes mellitus, tzv. „bronzový diabetes“), kůže (zvýšené ukládání melaninu), srdce (sekundární kardiomyopatie), endokrinní orgány (gonády, kůra nadledvin, hypofýza), klouby (bolestivé arthropathie). Laboratorní nálezy u primární hemochromatózy – koncentrace plazmatického železa > 30 $\mu\text{mol/l}$, saturace transferinu > 60 %, (redukce TIBC), feritinu (> 500 ng/ml).

1.1.6. Železo a zánětlivá odpověď

Zvýšená tvorba hepcidinu v důsledku zánětlivé odpovědi je hlavní determinantou, která určuje snížení celkového systémového železa a jeho sekvestraci v důsledku poklesu exprese feroportinu. Redukce feroportinu brání absorpci železa z potravy a navozuje retenci železa v buňkách RES (Ganz 2009, Roy 2005). Snížená dostupnost železa má za následek omezení erythropoézy (Ganz 2006). Charakteristické nálezy u anémie při zánětu nebo anémie chronických onemocnění zahrnují nízkou hladinu železa, nízkou vazebnou kapacitu pro železo a normální nebo zvýšené hladiny feritinu. Hecpidin je produkován buňkami imunitního systému (makrofágy, neutrofily) během přirozené imunitní odpovědi prostřednictvím dráhy závislé na toll-like receptoru-4 (TLR-4) (Peyssonnaud 2006). Ke stimulaci hepcidinu dále dochází prostřednictvím interleukinu 6 (IL-6), který je produkován neutrofily a Kupferovými buňkami jater (Nemeth 2004). IL-6 indukuje expresi transkripčního faktoru STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“), který se váže na promotor hepcidinu (Wrighting 2006). Další cestou regulace hepcidinu je komplex HJV/BMP. Je známo, že mutace hemojuvelinu má za následek juvenilní formu hemochromatózy (Pietrangelo 2006). HJV je koreceptorem pro BMPs (bone morphogenic proteins). BMPs jsou součástí rodiny transforming growth factor- β a výsledkem vazby na receptor je fosforylace Smad proteinů. Výsledkem translokace Smad proteinu do jádra je aktivace genové transkripce. U Smad4-deficientní myši bylo popsáno přetížení železem a porucha exprese hepcidinu (Wang 2005). Zajímavým nálezem je, že indukce exprese hepcidinu prostřednictvím IL-6 je inaktivní v případě poškození jaterního Smad4 a také že lipopolysacharidem indukovaná exprese hepcidinu je narušená při deficitu BMP6 (Meynard 2009). Tyto skutečnosti svědčí pro klíčovou roli Smad proteinů v signalizaci a expresi hepcidinu v odpovědi na zánět. Aktivace hepcidinu cytokiny je nezávislá na regulátorech HJV, TFR2 či HFE. Hemojuvelin sám je také regulován prostřednictvím prozánětlivého cytokinu TNF- α (Constante 2007). Redukce HJV má tak přídatný vliv v signální dráze HJV/BMP. Nejčastější forma hemochro-

matózy typ I je podmíněna různými mutacemi HFE genu. Nesprávná funkce HFE proteinu má za následek redukcí hladin hepcidinu a zvýšenou expresi feroportinu a snížení hladin železa v monocytech a makrofá-
zích (Cairo 1997, Moura 1998). Makrofágy pacientů s hemochromatózou produkují méně TNF- α a IL-6,
důležitých prozánětlivých cytokinů a tím jsou náchylnější k některým infekcím (Gordeuk 1992).

Ve studiích *in vitro* bylo prokázáno, že produkci hepcidinu stimulují i jiné cytokiny, včetně IL-1 β (Lee 2005).
Hepcidin cirkuluje vázaný na α 2-macroglobulin a v současné době jsou dostupné metody pro stanovení
jeho hladin v séru (Ganz 2008). Kromě výše uvedených mechanismů je hepcidin samozřejmě exprimován
i v odpovědi na stav zásobního železa v organismu tak, aby korigoval exportní aktivity feroportinu. Stav že-
leza je „senzován“ prostřednictvím změn v saturaci transferinu (Robb 2004). To odráží funkční interakce mezi
HFE a Tfr1 a Tfr2 (Schmidt 2008). Přesná koordinace těchto vzájemných interakcí je nezbytná k udržení
adekvátní imunitní odpovědi bez narušení metabolismu železa.

Kromě hepcidinu se na zánětlivé odpovědi podílejí i tumor necrosis factor- α a interferon- γ . TNF- α je prozá-
nětlivým cytokinem, který navozuje nízkou hladinu železa mechanismy nezávislými na indukcí hepcidinu
(Sharma 2005). Paradoxně vystavení makrofágů působení TNF- α bylo spojeno s přechodným vzestupem
intracelulárního labilního poolu železa, který se účastní v aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (Xiong 2003).
Transientní změny intracelulárního volného železa hrají důležitou roli v dalších stres-signálních odpovědích
(Deb 2009). IFN- γ stimuluje transkripci mRNA pro feritin, ale inhibuje jeho translaci a to navozením produkce
oxidu dusnatého (NO) a volných kyslíkových radikálů (ROS) makrofágem. NO a ROS podporují vazbu IRP-1
na IRE mRNA pro feritin, a tak snižují translaci feritinu. IFN- γ snižuje transkripci mRNA pro Tfr a tak i expresi
Tfr na membráně monocytu. Na druhé straně, studie *in vivo* demonstrovaly, že dieta s vysokým obsahem
železa redukuje IFN- γ (Omara 1994). Protizánětlivě působící cytokiny IL-4, IL-10 a IL-13, produkované Th-2
buňkami působí proti účinkům IFN- γ na homeostázu železa v makrofágu. Jejich podání tlumí tvorbu NO
a následnou aktivaci IRP. Zvyšují translaci feritinu i transkripci a syntézu Tfr. Protizánětlivě působící cytokiny
produkované Th-2 buňkami zvyšují tedy Tfr řízený přísun železa do makrofágu a podílí se spolu s prozá-
nětlivými cytokiny (TNF- α , IL-1 a IL-6) na poklesu hladiny železa a vzniku hyperferitinemie, hlavním patoge-
netickým mechanismem vedoucím k anémii chronických onemocnění (Weiss 2002). Nasycení makrofága žele-
zem má inhibiční vliv na aktivity IFN- γ (tj. tvorba TNF- α , exprese MHC antigenu II. třídy, tvorbu neopterinu).
Výsledkem je, že makrofágy ztrácejí schopnost bojovat proti intracelulárním patogenům pomocí mecha-
nizmů řízených IFN- γ (Legionella, Listeria, viry). Je snížena i syntéza NO, protože železo v labilním intracelu-
lárním poolu blokuje iNOS (inducibilní syntáza NO). Některé studie prokázaly nepříznivý průběh infekčních
onemocnění při zvýšené dostupnosti železa v organismu např. HIV, HCV, TBC aj. (Sartori 2002, Gordeuk
2001). Současně jsou známy studie popisující zvýšené riziko nádorových onemocnění a jejich nepříznivý
průběh při zvýšené dostupnosti železa v plazmě i tkáních (Stevens 1988).

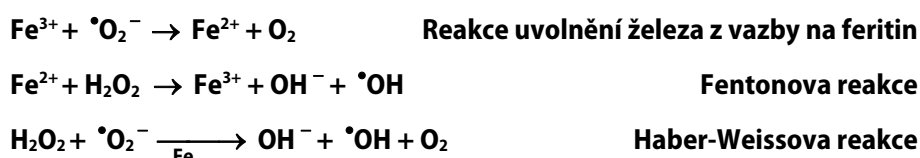
Transkripční kontrolní mechanizmy zvyšují expresi a hladiny feritinu během akutní zánětlivé odpovědi (Torti 2002). Prozánětlivě působící cytokiny TNF- α , IL-1 a IL-6 zvyšují syntézu feritinu, *in vitro* snižují TfR řízený přísun železa do buněk RES, ale jejich podání *in vivo* vede k poklesu hladiny železa. Proto se předpokládá, že tyto cytokiny stimulují přísun železa do makrofágu nezávisle na transferinu (např. cestou hemoglobinu, feritinu, lactoferinu, erytrofagocytózou nebo transmembránovými přenašeči pro železo). Současně mohou inhibovat export z buněk prostřednictvím ferroportinu-1 (IREG-1). Kombinace, buňkou řízeného snížení ferroportinu a zvýšení feritinu má za následek retenci železa a jeho sekvestraci.

Laktoferin je dalším imunitním faktorem se vztahem k metabolismu železa. Je produkován prsní žlázou a epiteliálními buňkami a je přítomen v mateřském mléce a v slizničních sekretech. Laktoferin je rovněž produkován neutrofily během zánětlivé odpovědi. Předpokládá se, že je scavengerem železa v místě zánětu. Má však prokazatelně i baktericidní funkci (Legrand 2005). Nicméně myši bez laktoferinu nevykazují poruchu imunitní odpovědi nebo porušenou homeostázu železa (Ward 2003).

Zásoby železa mohou výrazně modifikovat roli imunitního systému i v aterogenezi. Vysoké hladiny zásobního železa jsou spojeny s aktivací humorální i buněčné imunity (DePalma 2003). Bylo popsáno, že železo a proteiny vážící železo modulují funkci T lymfocytů, makrofágů i NK buněk (Bowlus 2003, Ahluwalia 2004). Ve studiích *in vitro*, bylo prokázáno, že železo má přímý aktivační účinek na makrofágy (Yuan 1995, Kraml 2005) a jejich vyžrávání v pěnovou buňku. S tím pak může souviset i následně zvýšená produkce cytokinů, zánětlivých mediátorů a cytoadhezivních molekul.

1.1.7. Železo a oxidační stres

Oxidační stres vystavuje organismus expozici volným kyslíkovým radikálům (ROS) jako jsou hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), superoxidový anion ($\cdot\text{O}_2^-$) a hydrogen peroxid (H_2O_2). Na buněčné úrovni mění redoxní potenciál, signální kaskády v buňce a poškozuje molekuly DNA, lipidů i proteinů (Aviram 1993). Způsobuje stárnutí organismu, aterosklerózu tepen, vznik nádorových onemocnění či reperfúzní poranění. Ve Fentonově reakci nenavázané dvojmocné železo katalyzuje přeměnu málo reaktivních $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 na vysoce reaktivní hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$. Trojmocné železo může být uvolněno z vazby na feritin superoxidovým aniontem za jeho současné redukce na železo dvojmocné (You 2005). Kromě toho nacházíme dvojmocné železo i v labilním intracelulárním poolu nebo v tzv. NTBI v plazmě (non-transferrin binding iron, železo nenavázané na transferin). Při reakci železa s kyslíkem může vznikat i komplexní perferlylový ion $[\text{Fe}(\text{II})\text{O}_2]$, který je minimálně stejně silným oxidačním činidlem jako hydroxylový radikál.



Mnoho buněk má schopnost oxidovat LDL – monocyty, makrofágy, neutrofilny, endoteliální buňky, hladké svalové buňky a fibroblasty, nicméně z hlediska aterosklerotického procesu a oxidace LDL *in vivo* mají nejdůležitější význam makrofágy, endoteliální buňky a hladké svalové buňky. Mezi známé oxidativní mechanismy patří NADPH oxidáza, myeloperoxidáza, cytochrom P450, mitochondriální dýchací řetězec, peroxy-nitrit, xanthinoxidáza, ceruloplazmin a lipoxygenáza. Detailní chemické studie s aterosklerotickými pláty s použitím různých reagentů prokázaly odlišné mechanismy oxidace LDL v různých stádiích vývoje plátu (Heinecke 1998). Peroxidace lipidů je iniciována napadením dvojnásobné vazby polynenasycených mastných kyselin (PUFA) volnými kyslíkovými radikály. Je tak odstraněn atom vodíku z metylenové skupiny (CH₂) s následnou přestavbou nestabilního uhlíkového radikálu na stabilnější konfiguraci – konjugovaný dien. Konjugovaný dien pak reaguje velmi rychle s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (Abuja 1995). PUFA peroxylový radikál v LDL může oddělit vodíkový atom ze sousední PUFA za vzniku hydroperoxidu a dalšího lipidového radikálu, reakce vedoucí k prodloužení řetězce. Odstranění vodíkových atomů peroxylovým radikálem z dalších lipidů, včetně cholesterolu, má konečně za následek vznik oxysterolů. Lipidové hydroperoxydy se rozpadají na aldehydy s krátkým řetězcem zahrnující malondialdehyd a 4 hydroxynonenal. Tyto reaktivní aldehydy se mohou vázat na *e*-aminoskupiny apo B-100 a předávají tak proteinu negativní náboj. Klasický LDL receptor rozpoznává pozitivní doménu lysinových, argininových a histidinových zbytků na apo B. Alterace této domény vede k selhání vazby na apo B/E receptor a zvýšení negativního náboje na povrchu apo B má za následek zvýšené rozpoznávání scavengerovým receptorem.

Samotná náchylnost LDL k oxidaci *in vivo* je ovlivněna složením LDL a mikroprostředím, ve kterém se odehrává. Vysoký obsah PUFA souvisí s větší náchylností k oxidaci, zatímco vysoký obsah mononenasycených mastných kyselin chrání proti oxidaci (Reaven 1991, Thomas 1996, Stocker 1991). Přítomnost antioxidantů (α-tokoferol, ubiquinol-10, karotenoidy) působí protektivně. Suplementace vitamínem E v dietě měla za následek rezistenci k mědi navozenou oxidací LDL *in vitro* a účinek byl závislý na dávce (Reaven 1993, Wiseman 1995, Suzukawa 1995). Velikost LDL částic je dalším faktorem, který se uplatňuje v náchylnosti k oxidaci (Chait 1993). Malé denzní LDL jsou náchylnější k oxidaci v porovnání s velkými LDL částicemi, může to být podmíněno obsahem antioxidantů (Tribble 1994). Zvýšené množství malých denzních LDL nacházíme u jedinců se zvýšenými triglyceridy, to je způsobeno metabolismem lipoproteinů o velmi nízké denzitě (VLDL), bohatých na lipidy. Z faktorů zevních (mikroprostředí, kde se LDL částice nachází) je nutné zmínit lokální koncentrace antioxidantů, dostupnost kovů se schopností katalyzovat tvorbu volných kyslíkových radikálů (Fe, Cu), kyselé pH a přítomnost specifických enzymatických systémů. Aktivované zánětlivé buňky a proces LDL oxidace mohou generovat protony. Samotné kyselé prostředí podporuje oxidaci LDL myeloperoxidázou a ceruloplazminem a ovlivňuje také interakci LDL s ostatními komponentami arteriální stěny (Young 2001).

Je známo, že chronická renální insuficience (CHRI) bývá spojena se zvýšenou prevalencí aterosklerózy (Ansari 1993, Sarnak 2003). V této souvislosti byl důležitý objev Witko-Sarsat et al., kteří našli signifikantně

vyšší hladiny pokročilých produktů oxidace proteinů (AOPP) u pacientů s CHRI (Witko-Sarsat 1998). AOPP jsou přenášeny plazmatickými proteiny, speciálně albuminem. *In vitro* je možné vytvořit AOPP expozicí sérového albuminu kyselině chlorné (HOCl). *In vivo* plazmatické koncentrace AOPP těsně korelují s hladinou diotyrozinu (ukazatelem oxidace proteinů) a pentosidinu (markerem glykooxidace proteinů) (Horie 1997). AOPP korelují s tloušťkou intimo-medie (Drüeke 2002) a stejně tak souvisí i s kardiovaskulárními příhodami (Descamps-Latscha 2005). Zvýšené hladiny AOPP byly popsány u diabetiků (Kalousová 2002) a pacientů bez CHRI s ischemickou chorobou srdeční (Kaneda 2002). Zvýšené hladiny AOPP mají vztah k ateroskleróze a nejsou specifické pouze pro CHRI. Nebylo zcela jasné zda AOPP jsou spíše epifenomenem reflektujícím oxidační stres při ateroskleróze nebo zda se přímo podílejí na iniciaci a progresi aterosklerózy. Odpověď na tuto otázku přinesla studie Liu et al. – králíci, kteří byli na hypercholesterolemické dietě a zároveň dostávali intravenózní infuze s AOPP vykazovali signifikantně vyšší množství aterosklerotických plátů a současně i vyšší hladiny oxLDL v porovnání s kontrolním souborem (Liu 2006). AOPP působí navíc i prozánětlivě – ve studii *in vitro* bylo prokázáno, že stimuluje expresi MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) v kultuře vaskulárních hladkých svalových buněk (Peng 2006).

1.1.8. Železo a inzulínová rezistence

V epidemiologických studiích byla nalezena asociace mezi vysokými endogenními zásobami železa v organismu a inzulínovou rezistencí u diabetes mellitus 2. typu (Dandona 1983). Podobně experimentální práce se zvířaty prokázaly, že snížené zásoby železa zlepšují inzulínovou senzitivitu (Borel 1993, Farrell 1988). Vysoké endogenní zásoby železa mají vztah k obezitě (Ford 1999) a jsou rovněž jednou z komponent metabolického syndromu (Vari 2007). Hladiny sérového feritinu v různých studiích korelovaly s molekulami odvozenými z tukové tkáně jako jsou leptin (Aleman 2002), IL-6 (Papadaki 1997), TNF- α (Alexandrakis 2003) nebo adiponectin (Mojiminiyi 2007). Asociace mezi zvýšenou akumulací železa v játrech a metabolickými abnormalitami byla poprvé označena Mandlerem et al. jako syndrom přetížení jaterním železem asociovaný s inzulínovou rezistencí (insulin resistance associated hepatic iron overload syndrome – IR-HIO) (Mandler 1999). Vztah mezi akumulací železa v játrech a inzulínovou rezistencí potvrdily i další studie (Fernandez-Real 2002). Je známo, že heterozygoti s mutací v HFE genu s nealkoholickou steatózou jater secernují menší množství inzulínu a vyvinou dříve jaterní steatózu v přítomnosti lehčích metabolických alterací než pacienti bez mutace v HFE genu (Valenti 2003). U nealkoholické jaterní steatózy (NAFLD) a steatohepatitidy (NASH) dochází v játrech k excesivní akumulaci triacylglycerolů, zvýšenému oxidačnímu stresu a zánětu. Na zvýšení oxidačního stresu se může podílet zvýšený obsah železa v játrech, jak dokladují nálezy zvýšených zásob železa v játrech a hyperferitinémie u pacientů s NASH. Se zvýšeným obsahem železa v játrech korelovaly ve studii i zvýšené hladiny thioedoxinu (indikátoru oxidačního stresu) (Sumida 2003). Nicméně zvýšený obsah feritinu v játrech u NASH může být také odrazem samotného oxidačního stresu a probíhajícího zánětu (Sumida 2001). Z tohoto pohledu je kauzální role železa v patogenezi NASH zatím nejednoznačná. Recentní austral-

ská studie, zaměřená na regulační molekuly pro železo v jaterní tkáni, odhalila překvapivé snížení jaterního feroportinu-1 a hemojuvelinu. Autoři našli u NAFLD inverzní korelaci mezi koncentrací TNF- α a expresí feroportinu-1 a hemojuvelinu *in vivo* a sníženou tvorbu feroportinu-1 a hemojuvelinu u HepG2 buněk po stimulaci TNF- α *in vitro*. Vyvodili proto závěr, že akumulace železa v játrech při NAFLD může být důsledkem snížené mobilizace železa z hepatocytů v důsledku nízké exprese feroportinu-1 a hemojuvelinu (Aigner 2008). Otogawa et al. objevili další možnou cestu akumulace železa v játrech prostřednictvím zvýšené erytrofagocytózy jaterními makrofágy – Kupfferovými buňkami (Otogawa 2007). Imunohistochemicky byla v jaterní tkáni pacientů s NASH zjištěna zvýšená agregace erytrocytů v zánětlivě změněných hepatálních sinusech, která vedla k depozitům železa a oxidačnímu stresu.

Z hlediska patogeneze je popisováno několik mechanismů, kterými železo může vést k rozvoji DM 2. typu. Železo působí silně prooxidačně tvorbou volných kyslíkových radikálů a oxidační stres se podílí na poruše inzulínové senzitivity (Wolff 1993). Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) mohou v organismu fungovat jako signální molekuly, které aktivují řadu buněčných pochodů a ovlivňují funkci inzulínového receptoru (Houstis 2006). *In vitro*, ROS aktivují serin-kinázy (Kyriakis 1996). Signální buněčné dráhy pak nabízejí mnoho substrátů pro takto aktivované kinázy, zahrnují inzulínový receptor a rodinu substrátových proteinů inzulínového receptoru. Zvýšená fosforylace serinu snižuje fosforylaci tyrozinu, a tak ovlivňuje účinek inzulínu na inzulínový receptor (Paz 1997, Evans 2003).

Vysoké zásoby železa v játrech mohou navodit inzulínovou rezistenci omezením jaterní kapacity pro extrakci inzulínu. To má za následek poruchu v supresi produkce glukózy játry a periferní hyperinzulinémií (Niedermaier 1984, Ferrannini 2000). Deplece železa naopak zlepšuje intracelulární signalizaci v hepatocytu po navázání inzulínu, zvyšuje transkripci a expresi inzulínových receptorů v hepatocytu i expresi genů zahrnutých do příjmu glukózy (Fargion 2005). V kosterním svalu může být dalším mechanismem inhibice translokace glukózových transportérů GLUT 1 a 4 při nadbytku železa a zvýšení aktivity po depleci železa (Potashnik 1995). Zvýšené zásoby železa ve svalu mohou usnadňovat oxidaci volných mastných kyselin a tak interferovat s metabolismem glukózy. Podobně může železo ovlivňovat účinek inzulínu v adipocytech ovlivněním transportu glukózy nezávisle na mastných kyselinách (Green 2006). Nadbytek železa v organismu může mít také za následek ukládání železa přímo do pankreatických β -buněk resultující v poruchu inzulínové sekrece (Wilson 2003).

Vztah železa a inzulínu není jednostranný, i samotný inzulín může ovlivňovat metabolismus železa. *In vitro* data naznačují, že inzulín zvyšuje expresi transferinových receptorů na povrchu buněk tukové tkáně a jater (Davis 1986). Tento náález byl potvrzen i ve studii s potkany, kdy podání inzulínu vedlo ke zvýšení sérových hladin cirkulujících transferinových receptorů (Clairmont 1990). Rovněž v humánní studii byla popsána inverzní korelace mezi hladinou cirkulujících transferinových receptorů a inzulínovou senzitivitou (Fernandez-Real 2007). Dalším zajímavým mechanismem je působení neenzymové glykace na hemové proteiny.

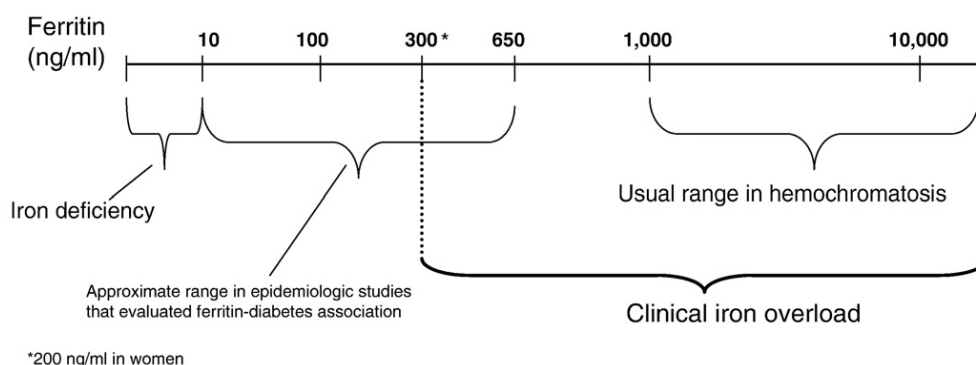
Cussimano et al. objevili, že hemoglobin a myoglobin jsou extrémně citlivé na vysoké hladiny glukózy, proces neenzymové glykace vede ke kompletní destrukci esenciální hemové skupiny a uvolnění železa (Cussimano 2003). Diabetická hyperglykémie tedy vede ke glykaci proteinů vázajících železo, které uvolňují více železa do cirkulace a volné železo dále akceleruje oxidační stres a proces tvorby AGE. Tato kruhová reakce se pak může spolupodílet na diabetických komplikacích. Je známo, že interakce AGE s jejich AGE receptorem u diabetu mellitu vede k oxidačnímu stresu a indukci hemoxygenázy-1 (Cosso 2001). Hemoxygenáza-1 je enzym, který katalyzuje degradaci hemu s produkcí biliverdinu, železa a CO. Hemoxygenáza-1 je inducibilní v odpovědi na oxidační stres, hypoxii, těžké kovy a cytokiny. U diabetiků je přítomna snížená exprese a aktivita hemoxygenázy-1 a tím i snížená antioxidační kapacita (Liu 2005, Merzouk 2004). Zároveň mají diabetici porušenou vazebnou kapacitu pro železo a tím i vyšší náchylnost tkání k oxidačnímu poškození (Van Campenhout 2006).

U pacientů s DM 2. typu byly nalezeny změny i v dalších parametrech metabolismu železa kromě feritinu. Například v průřezové studii na pacientech s DM 2. typu autoři popsali nejen vyšší hladiny sérového feritinu, ale i vyšší hladiny cirkulujícího železa nenavázaného na transferin (NTBI) v porovnání se zdravými kontrolami (Lee 2006). Je nutné zdůraznit, že průřezové studie jsou limitovány potenciálním zkreslením (bias) obrácené kauzality, tedy že diabetes sám může být příčinou zvýšené hladiny sérového feritinu. Kauzalitu ve prospěch železa však potvrzují nálezy vyšší prevalence DM 2. typu u hemochromatózy a také nálezy z experimentálních studií, kdy parenterální aplikace železa zvířatům vedla k rozvoji DM 2. typu (Awai 1979). Prospektivní studie hodnotící asociaci mezi hladinami železa v organizmu a diabetes mellitus 2. typu potvrdily také vyšší riziko vzniku DM 2. typu u jedinců s vysokými endogenními zásobami železa (Salonen 1998, Jehn 2007, Forouhi 2007). Nicméně se jedná o observační studie a nelze v nich zcela spolehlivě vyloučit zastření kauzálního vztahu železo-diabetes dalšími přídatnými faktory a to zejména obezitou a zánětem.

Z intervenčních studií je známo, že pravidelné odběry krve zlepšují inzulínovou senzitivitu (Facchinini 1998, Fernández-Real 2005). Facchini et al. prokázali zlepšení v hladinách jaterních enzymů po opakovaných flebotomiích u pacientů s NAFLD s poruchou glukózové tolerance (Facchini 2002). Deplece železa pravděpodobně zlepšuje intracelulární signalizaci v hepatocytu po vazbě inzulínu, zvyšuje transkripci a expresi inzulínových receptorů v hepatocytu i expresi genů zahrnutých do příjmu glukózy (Fargion 2005). Také intravenózní terapie deferoxaminem (chelát železa) u 9 diabetiků 2. typu bez hemochromatózy vedla k signifikantnímu zlepšení metabolické kontroly – tj. snížení glykemií a hladin glykovaného hemoglobinu (Cutler 1989). Jiná studie ale tyto nálezy nepotvrdila (Redmon 1993). Data z experimentálních studií s potkany, u kterých byly prováděny častější odběry krve, potvrdila redukci v incidenci DM 2. typu (Yale 1988). V současné době však nejsou známy žádné studie dokladující přímý vliv pravidelných odběrů krve u lidí na rozvoj DM.

Jsou známy i prospektivní studie sledující vztah mezi dietním příjmem železa a rizikem DM 2. typu (Jiang 2004, Lee 2004, Rajpathak 2006). Ve všech byl příjem hemového železa v potravě spojen se zvýšeným rizi-

kem vzniku DM 2. typu. Nelze však vyloučit i podíl dalších faktorů. Například zvýšený příjem hemové železa, které je součástí červeného masa, může být i odrazem, zvýšeného kalorického příjmu a tuků v potravě apod.



Rozsah sérových hladin feritinu ve vztahu k diabetes mellitus 2. typu
Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, Hu FB: The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta* 2009,1790: 671-681.

1.2. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces, který je odpovědí na poškození endotelu s rozvojem endotelové dysfunkce, produkcí cytoadhezivních molekul a celé řady chemokinů. Tohoto fibroproliferativního procesu se účastní klasické komponenty zánětu – monocyty, lymfocyty, endotelie, hladké svalové buňky medie a trombocyty, z látkových faktorů pak různé cytokiny, růstové faktory a látky s vasoregulační aktivitou. Aterosklerotické léze postihují fokálně asymetricky tepny velkého a středního průsvitu, které obsahují ve své stěně vrstvu hladké svaloviny (tunica media). Ateromům předchází vznik lipidní proužků, které jsou tvořeny agregáty makrofágů bohatých na lipidy a T lymfocytů uvnitř intimy. Lipidní proužky vznikají již v dětském věku, na koronárním řečišti jsou detekovány u poloviny dětí ve věku 10-14 let. Nezužují lumen arterií a některé progredují do fibromuskulárních či fibrózních ateromů, jiné mizí. Fibrózní pláty (ateromy) již částečně okludují lumen tepny a způsobují její bělavé zbarvení. Na povrchu jsou kryty fibrózní čapkou tvořenou buňkami hladkých svalů a na kolagen bohatou matrix. V jádru ateromu nacházíme četné makrofágy s obsahem LDL partikulí – pěnové buňky, buňky hladkého svalstva, T lymfocyty, zbytky apoptotických buněk (většinou makrofágů) a zmnožené vazivo. Komplexní léze vznikají další progresí fibrózních plátů, jejich kalcifikací a především pak degenerativními změnami (ulcerace, ruptura), které se stávají místem zvýšené agregace trombocytů. Trombóza je pak příčinou náhlého cévního uzávěru. Z klinického hlediska se pláty dělí na stabilní a nestabilní. Stabilní plát má nízký obsah tuků a nemá tendenci k ruptuře s vytvořením následné trombózy. Nestabilní plát je bohatý na lipidy a často při okraji praská. Dává tak vznik okludujícímu trombu na povrchu plátu. Výsledkem je akutním tepenný uzávěr.

Ross považuje poškození endotelu za základ v rozvoji aterosklerotické léze. Endotel je jednovrstevná výstelka všech krevních cév. Jeho hmotnost u dospělého člověka činí 1,5 - 3 kg a má řadu fyziologických funkcí:

1. Působí jako propustná bariéra zajišťující výměnu a aktivní transport látek do arteriální stěny.
2. Udržuje vaskulární tonus tvorbou a uvolňováním molekul jako je NO, prostacyclin (PGI₂) – vazodilatace a endotelin (ET) – vazokonstrikce.
3. Secernuje růstové faktory a cytokiny (PDGF, bFGF, M-CSF/GM-CSF, IL1, TNF-alfa, MCP-1).
4. Zajišťuje netrombogenní povrch cévní stěny a brání adhezi leukocytů.
5. Chrání proteoglykany a kolagen bazální membrány.

Hlavním spouštěcím mechanismem aterosklerózy je poranění endotelu, ke kterému dochází cestou mechanického stresu (akcelerovaná hypertenze, turbulentní proudění), chemickým poškozením (např. volné kyslíkové radikály, oxLDL, hyperglykemie, kouření, homocystein), vlivem infekce (*Chlamydia pneumoniae*, *Cytomegalovirus*, *Herpesvirus*, *Helicobacter pylori*) a/nebo autoimunitním onemocněním (např. systémový lupus erythematosus). Nejčastěji se však jedná o kombinovaný účinek několika výše uvedených mechanismů. Poškozené endotelie exprimují na svém povrchu různé typy adhezivních molekul, které jsou zodpovědné za adhezi leukocytů na vaskulárním povrchu a následném průniku do místa aktivace zánětu. Typicky je zvýšena exprese vaskulární cytoadhezivní molekuly (VCAM-1), intercelulární cytoadhezivní molekuly (ICAM-1), E-selektinu a P-selektinu. Na cytoadhezivní molekuly adherují svými receptory a integriny monocyty, lymfocyty i trombocyty (např. LFA-1 – lymphocyte function-associated antigen-1 nebo VLA-4 – very late antigen-4). Endotelie produkují i MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), který přitahuje monocyty prostřednictvím receptoru CCR2. Po adhezi na endotel penetrují monocyty a později i lymfocyty do subendotelového prostoru intimy v odpovědi na chemokiny. M-CSF (macrophage colony stimulating factor) a TNF α (tumor necrosis factor alpha) produkovaný lymfocyty v zánětlivé intimě indukuje diferenciaci monocytů v makrofágy. Přeměnou monocyty v makrofágy dojde ke zvýšení počtu scavengerových a toll-like receptorů na jeho membráně. Toll-like receptory (TLR) jsou součástí přirozené imunitní odpovědi a specificky rozpoznávají molekuly patogena (např. endotoxin, HSP 60, hyaluronan), dále fragmenty apoptotických buněk a oxLDL. Jsou transmembránově uloženy a na rozdíl od scavengerových receptorů nezprostředkovávají endocytózu. Po vazbě ligandu na toll-like receptor dojde k iniciaci signální kaskády proteinkináz, které na svém konci aktivují nuclear factor-kappa B (NF- κ B). To vede k produkci IL-8 (chemotaxe neutrofilů a T lymfocytů, usnadnění adheze na endotelie, aktivace NADPH oxidázy neutrofilů), MCP-1 (chemotaxe monocytů), zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů, ale i tumor necrosis faktoru alfa (TNF- α), interferonu gamma (INF- γ), IL-1 a IL-6 (Edfeldt 2002). Mutace lidského TLR-4, Asp299Gly polymorfismus, je spojena se sníženou incidencí aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění (Kiechl 2002). Kromě makrofágů exprimují TLR i dendritické buňky, žírné buňky, a endoteliální buňky. Scavengerové receptory jsou schopné vázat široké spektrum molekul – molekuly patogenů, endotoxiny, apoptotické fragmenty buněk a především oxLDL. OxLDL jsou zavzaty endocytózou do makrofágy, dochází k jejich intracelulární akumu-

laci a následně přeměně makrofága v pěnovou buňku, základní stavební kámen budoucího ateromového plátu. Tento proces je augmentován při zánětu, neboť cytokiny a endotoxiny inhibují expresi ATP-binding cassette transportérů (ABCA1, ABCG1), které exportují cholesterol z buňky. Za nejdůležitější zástupce široké rodiny scavengerových receptorů jsou považovány receptory MSR-A (CD204) a MSR-B (CD36). Scavengerový receptor byl objeven v roce 1979 (Goldstein 1979). Od doby prvních podtypů MSR- A typu I a typu II rec (Kodama 1990, Rohrer 1990) se rodina scavengerových receptorů velmi rozrostla. Podílejí se kromě pohlcování modifikovaných LDL i na nepřiměřené imunitní odpovědi, cytoadhezi a fagocytóze apoptotických buněk. *In vivo* studie na SR-A- nebo CD36-knock-out hypercholesterolemických myších jasně prokázaly, že vyřazení každého z receptorů inhibuje částečně přísun acetylovaných nebo oxidovaných LDL do makrofágů. Signifikantně se zpomalila progresse aterosklerotických lézí u myší s vrozenou hypercholesterolemií (Febbraio 2000). Scavengerový receptor typu A váže acetylované LDL, které se však nevyskytují za fyziologických podmínek a je známo, že s nimi o vazbu kompetuje i oxLDL. Scavengerový receptor typu A byl detekován na makrofágách *in vivo* i *in vitro*, v játrech, v aortě a v nadledvinkách. Nejvíce je však exprimován pěnovou buňkou (Gough 1999). Scavengerový receptor typu B (CD36), specificky rozeznává oxidované LDL. Jeho exprese na makrofágách je modulována TNF- α a cytokiny. V *in vitro* studiích vedla expozice k LDL, oxLDL a apoB ke zvýšení exprese CD36 na povrchu makrofágů. Naopak HDL a bovinní sérový albumin snižují expresi CD36 (Febbraio 2001). Prolongovaná expozice vysokým koncentracím glukózy (11 mmol/l a 33 mmol/l) *in vitro* vedla až pětinasobné zvýšení exprese CD36 na makrofágách (Griffin 2001). *In vivo* byla popsána rovněž zvýšená exprese CD36 na monocytech v periferní krvi u DM 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou (Sampson 2003). Pokročilé produkty glykace (AGE) diabetiků se váží na AGE receptory na makrofágách, endoteliálních buňkách a hladkých svalových buňkách. Aktivují zánětlivé kaskády prostřednictvím NF- κ B, podobně jako ligandy TLR. Výsledkem aktivace makrofága v ateromu je produkce vazoaktivních molekul – oxidu dusnatého, endotelinu, eikosanoidů. Buňky monocyto-makrofágového systému jsou tedy klíčové jak pro metabolismus železa, tak pro iniciační fáze a progresi aterosklerózy. Aktivovaný makrofág zvýšeně exprimuje myeloperoxidázu (MPO), inducibilní syntázu oxidu dusnatého (iNOS) a NADPH oxidázu, enzymy které katalyzují produkci volných kyslíkových radikálů (ROS). ROS jsou cytotoxické a oxidují lipoproteiny. Oxidované LDL stimulují chemotaxi cirkulujících leukocytů a trombocytů, modulují genovou expresi různých růstových faktorů, cytokinů i adhezivních molekul. Konečně makrofágy syntetizují i proteolytické enzymy degradující komponenty matrix. Ztráta komponent matrix může následně vést k destabilizaci plátu, jeho ruptuře a nasedající trombóze. Buňky v ateromovém plátu (makrofágy, T lymfocyty, endotelie, trombocyty) secernují při aktivaci i řadu růstových faktorů a cytokinů, především VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (fibroblast growth factor), TGF- β (transforming growth factor beta), interleukiny (1, 6, 18 aj.) (Aso 2003) a TNF- α (tumor necrosis factor alfa), kterými působí na buňky hladké svaloviny medie. V místě ateromové léze buňky hladké svaloviny medie migrují do intimy, kde produkují vazivová vlákna extracelulární matrix. Tato funkce představuje vlastní fibroproliferativní složku zánětlivé odpovědi cévní stěny. V zásadě rozlišujeme dva fenotypy hladkých svalových buněk v cévní stěně: fenotyp kontraktilní a fenotyp syn-

tetický. Buňky kontraktálního fenotypu mají schopnost reagovat na vasodilatační, resp. vazokonstrikční podněty (NO, acetylcholin, bradykinin, endotelin, katecholaminy, angiotenzin II, PGE, PGI-2 (prostaglandin E, I₂), neuropeptidy a leukotrieny. Buňky syntetického fenotypu produkují extracelulární matrix (kolagenní a elastické fibrily a proteoglykany) i buněčné růstové faktory a cytokiny (např. bFGF-1, M-CSF, IGF-1, IL-1, TNF- α , TGF- β). T lymfocyty jsou přítomny v aterosklerotických lézích ve všech stádiích aterosklerotického procesu. V ateromech převažují CD4⁺ lymfocyty, které nesou na svých membránách T receptory, pomocí kterých rozpoznávají komplexy malých peptidových fragmentů antigenů a MHC glykoproteinů II. třídy (major histocompatibility complex) na povrchu antigen prezentujících buněk (makrofágů). Reagují na antigeny přítomné v plátu (oxLDL, HSP 60 a další). Nacházíme však i v malém zastoupení CD8⁺ lymfocyty, které rozpoznávají antigen spolu s MHC glykoproteiny I. třídy a T lymfocyty přirozené zabíječe tzv. T natural killers, které reagují na lipidy prezentované na povrchu APC buněk spolu s CD1 molekulou (nikoliv na MHC glykoproteinech), po aktivaci produkují rovněž IFN- γ . CD4⁺ lymfocyty reagují pod vlivem cytokinů diferenciací buď v Th1 nebo Th2 linii. V aterosklerotických lézích převažuje Th1 odpověď. Je charakterizovaná zvýšenou produkcí IFN γ , TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-12 a IL-18 (na rozdíl od Th2 lymfocytů s převažující produkcí IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 a GM-CSF). IFN- γ zlepšuje efektivitu činnosti antigen prezentujících buněk a navozuje u nich syntézu TNF- α , IL-1 a IL-6, která vede k dalšímu rozvoji zánětu. Regulačně působící T lymfocyty modulují zánětlivý proces produkcí protizánětlivě působících cytokinů IL-10 a TGF β . Malý podíl Th2 odpovědi po prezentaci antigenu může navozovat antiateroskleroticky působící imunitní reakce. Na druhou stranu jsou doklady, že může vést i k produkci lytických enzymů vedoucích k rozvoji aneurysmatu v místě léze. Role Th2 lymfocytů je tedy v aterogenezi kontroverzní (Hansson 2006). Zvýšená produkce IFN- γ , TNF- α a IL-1 lymfocyty a makrofágy navozuje zvýšenou syntézu IL-6, který dále stimuluje hepatocyty k produkci proteinů akutní fáze – CRP, sérového amyloidu a fibrinogenu. Zvýšené hladiny IL-6 a CRP můžeme detekovat v séru. Úloha přirozených zabíječů (natural killers cells) a žírných buněk v patogenezi aterosklerózy je zatím málo probádaná. Protilátky produkované nečetnými B lymfocyty v aterosklerotických lézích mají spíše antiaterogenní aktivitu. Zřejmě je to způsobeno podílem na eliminaci oxidovaných LDL. Zajímavé je, že pacienti po splenektomii vykazují zvýšenou incidenci kardiovaskulárních onemocnění. Kromě výše uvedených vlivů se uplatňují i metabolické faktory. Tuková tkáň u obézních pacientů a pacientů s metabolickým syndromem ve zvýšené míře produkuje TNF- α a IL-6. Navíc zánětlivou odpověď mohou modulovat i adipokiny (leptin, adipokinin a rezistin). V patogenezi aterosklerózy se popisuje několik možných mechanismů působení infekčních agens na cévní stěnu. Jedním z nich je molekulární mimikry – strukturální podobnost mezi antigeny kódovanými různými geny (např. stresové proteiny). Infekce endotelu vede k syntéze a expresi HSP60 na povrchu endotelových buněk a přímému navození imunitní odpovědi. *Chlamydia pneumoniae* syntetizuje vlastní stresový protein, který má velmi podobnou strukturu jako lidský HSP60 a prostřednictvím molekulární mimikry navozuje autoimunitní odpověď vedoucí k poškození cévní stěny. Dalším je produkce toxinů (gram-negativní bakterie). Endotoxin může spustit a akcelarovat aterosklerózu poškozením endotelu, zvýšením produkce volných kyslíkových radikálů stimulací NADPH oxidázy ve fagocyty i zvýšením syntézy

chemotaktických a prozánětlivých cytokinů, proteinů akutní fáze a cytoadhezivních molekul s následnou invazí monocytů, neutrofilů a T lymfocytů do cévní stěny. Epidemiologické studie prokázaly, že endotoxemie o hladině alespoň 50 pg/ml představuje silný rizikový faktor pro rozvoj aterosklerózy. Jsou důkazy o tom, že cytomegalovirus a *Chlamydia pneumoniae* mohou cíleně napadat endotelové buňky. Dalším předpokádaným mechanismem je „echo“ hypotéza předpokládá indukci systémové imunitní odpovědi vedoucí k produkci zánětlivých buněk a cytokinů, které mohou exacerbovat aterosklerotický proces ve stěnách cév (tj. mimo vlastní infekční focus). Zde se může uplatňovat i zátěž několika patogeny „pathogen burden“. U aterosklerózy neplatí tradiční Kochovy postuláty, kdy infekční agens musí být přítomno u každého případu onemocnění, je možné ho izolovat z hostitele, vykultivovat *in vitro*, přenést a inokulovat jím dalšího zdravého jedince, u kterého vyvolá stejné onemocnění. Potvrzují to i negativní výsledky studií s paušálním nasazením antibiotik u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (akutním koronárním syndromem). Je však zřejmé, že virové i bakteriální infekce (výše zmíněnými patogeny) mohou vést k poškození cévní stěny, rozvoji i akceleraci aterosklerózy. Časté rekurentní či perzistující infekty mohou způsobovat opakovaná vzplanutí imunitního systému vedoucí k urychlení tvorby ateromových plátů a zvýšené incidenci kardiovaskulárních onemocnění – koncept zátěže patogeny (Srovátka 2007).

Hyperglykémie a ateroskleróza

Hyperglykémie může akcelarovat aterosklerotický proces třemi hlavními mechanismy: neenzymatickou glykosylací proteinů a lipidů v arteriální stěně (Maillardovou reakcí), oxidačním stresem a aktivací proteinkinázy C (Aronson 2002). Tyto mechanismy jsou vzájemně propojené, nikoliv nezávislé (Nishikawa 2000). Během neenzymové glykace proteinů dochází k navázání Glc na N-konce Lys proteinů za vzniku Schiffovy báze (aldiminu). Aldimin je labilní, po několika hodinách se konvertuje tzv. Amadoriho přesmykem na Amadoriho produkt, ketoamin. K vzniku těchto produktů není třeba enzymatického působení. Aldimin a ketoamin se nazývají časné produkty glykace. Jejich vznik závisí pouze na stavu glykemie a délce jejího působení. Dosud popsané děje jsou reverzibilní. V další fázi jsou Amadoriho produkty buď oxidovány na ireverzibilní lyzinové zbytky (N-karboxymetyllyzin) nebo vznikají vysoce reaktivní meziprodukty, které vedou k formování heterocyklických proteinových sloučenin. Cyklizací a příčným síťováním (crosslinking) tak vznikají AGE (advanced glycation end-product), které jsou pozdními produkty glykace proteinů (Maillardovy produkty) a jejich vznik je ireverzibilní. Modifikace proteinů souvisí se změnou jejich vlastností (inaktivace enzymů, inhibice tvorby regulačních molekul, snížená citlivost k proteolýze, abnormality ve funkci, zvýšená imunogenita), zesíťováním glykoproteinů a indukci lipoperoxidace. Tyto vlastnosti jsou fixovány po celou funkční dobu proteinu, což je závažné zvláště u strukturálních proteinů poжив s dlouhým biologickým poločasem. Stupeň neenzymové glykace je určován především koncentrací glukózy a délkou expozice. AGE mohou akcelarovat aterosklerózu různými mechanismy, které mohou být řízené přes receptory nebo na receptorech nezávislé. Na receptorech nezávislé mechanismy jsou v extracelulární matrix – zesíťování kolagenu

(crosslinking) (Brownlee 1986), zvýšená syntéza komponent extracelulární matrix (Brownlee 1988), vychytávání LDL v subendoteliálním prostoru (Brownlee 1985) a snížení tvorby oxidu dusnatého glykosylací subendoteliální matrix (Bucala 1991). Dalšími na receptorech nezávislémi mechanismy jsou funkční alterace regulačních proteinů – např. glykosylace bFGF (basic fibroblast growth factor) redukuje jeho vazebnou kapacitu pro heparin i jeho mitogenní aktivitu na nedoteliálních buňkách (Giardano 1996) a dále inaktivace regulačního proteinu komplementu CD59 (Acosta 2000). V neposlední řadě jsou to neenzymové modifikace lipoproteinů – glykosylace LDL (jak ApoB tak fosfolipidů) (Bucala 1994), zhoršené rozpoznávání změněných LDL buněčnými LDL receptory (Steinbrecher 1994) a zvýšená náchylnost glykovaných LDL k oxidativní modifikaci (Bucala 1993) a vychytávání takto glykovaných či oxidativně modifikovaných LDL scavengerovými receptory makrofágů s jejich následnou přeměnou v pěnové buňky. Buňky zapojené do aterosklerotického procesu (endotelové buňky, makrofágy a hladké svalové buňky) nesou na svém povrchu receptor pro AGE (RAGE) (Brett 1993, Schmidt 1994). Vazba AGE na receptory endotelových buněk má za následek indukci oxidačního stresu, následně NF- κ B (Yan 1994, Wautier 1994) a produkci cytoadhezivních molekul např. VCAM-1 (Schmidt 1995), zvýšení permeability endotelu a zvýšení prokoagulační aktivity endotelu (Eposito 1989). Výsledkem je potom zvýšené pronikání LDL částic do subendoteliálního prostoru a zvýšená adhezivita monocytů na endotel následovaná transendoteliální migrací. Vazba AGE na receptory monocytů indukuje chemotaxi (Schmidt 1993), následovanou infiltrací mononukleárů přes intaktní endotel (Kirstein 1990). Navázání AGE rovněž stimuluje makrofágy ke zvýšené produkci mediátorů TNF- α , IL-1, PDGF a IGF-1 (Vlassara 1998, Kirstein 1992), které hrají klíčovou roli v patogenezi aterosklerózy. Vazba AGE na RAGE hladkých svalových buněk je asociovaná se zvýšenou celulární proliferací. Hyperglykémie a zvýšená tvorba diacylglycerolu aktivuje proteinkinázu C. Bylo prokázáno, že aktivace PKC v hladkých svalových buňkách cévní stěny může modulovat tvorbu růstových faktorů, jejich vazbu na receptory i syntézu DNA (Koya 1998). Např. aktivace PKC navozená hyperglykemií zvyšuje expresi PDGF- β receptoru v hladkých svalových buňkách, endoteliích a monocytech/makrofázích (Inaba 1996). Aktivace PKC také zvyšuje expresi TGF- β , nejdůležitějšího růstového faktoru v regulaci extracelulární matrix prostřednictvím aktivace exprese proteoglykanů a kolagenu a poklesu syntézy enzymů degradujících ECM (Nabel 1993). Proteinkináza C ve vaskulární tkáni může být také aktivována prostřednictvím oxidačního stresu. Hyperglykémie sama o sobě zvyšuje intracelulární tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů v respiračním řetězci mitochondrií s následnou zvýšenou produkcí superoxidu (Nishikawa 2000). Jinými mechanismy spojenými se zvýšením oxidačního stresu jsou autooxidace volné glukózy, při které jsou produkovány superoxidový anion a hydrogen peroxid (Wolff 1993) a také již zmiňovaná indukce oxidačního stresu prostřednictvím AGE. Navíc některé AGE vznikají kombinovaným procesem glykace a oxidace a nazývají se proto glykooxidační produkty (Baynes 1991). U diabetiků byly také pozorovány snížené hladiny antioxidantů glutationu (Yoshida 1995), vitamínu E (Karpen 1985) i vitamínu C (Yue 1989). Hyperglykémie tedy může poškozovat endotel a ovlivňovat signální dráhy v makrofázích a hladkých svalových buňkách řadou výše uvedených mechanismů a tak akcelarovat aterosklerotický proces.

1.3. ŽELEZO JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR ATEROSKLERÓZY

V roce 1981 byla Sullivanem navržena hypotéza založená na nižší incidenci ICHS u premenopauzálních žen v porovnání s ženami po menopauze a muži (Iron-heart hypothesis) (Sullivan 1981). Usuzoval, že zvýšené endogenní zásoby železa jsou rizikovým faktorem ischemické choroby srdeční a že pravidelné ztráty krve mohou toto riziko redukovat. Tato hypotéza vycházela z charakteristických chemických vlastností železa. Kromě schopnosti katalyzovat tvorbu volných kyslíkových radikálů s následnou oxidací biomolekul např. LDL, zvyšuje železo riziko kardiovaskulárního onemocnění i přímou alterací endoteliální funkce s poklesem vaskulární reaktivity (Lekakis 1999, Duffy 2001, Gaenzer 2002). Řada studií prokázala, že feritin chrání buňky před oxidačním stresem redukcí intracelulárního labilního poolu železa (Orino 2001, Arosio 2002). Feritin však může působit i prooxidačně jako donor železa. Superoxidový anion způsobuje uvolnění železa z feritinu, které se následně stává toxickým pro organizmus ($\text{Fe}^{3+} - \text{feritin} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{apoferitin} + \text{O}_2$). Salonen jako první publikoval signifikantní asociaci mezi hladinou sérového feritinu a rizikem infarktu myokardu ve finské studii KIHD (Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study) (Salonen 1992). Studie se zúčastnilo celkem 1931 mužů středního věku, průměrná doba sledování byla 3 roky. Muži se sérovým feritinem > 200 ng/ml měli 2,2x vyšší riziko IM než muži s nízkou hladinou feritinu ($p < 0,01$) a tato asociace byla vyšší ve skupině mužů s LDL > 5 mmol/l. V následné analýze pak byla zjištěna pozitivní korelace mezi poměrem cirkulujících transferinových receptorů / feritinu k výskytu kardiovaskulárního onemocnění ($p = 0,035$). Klipstein-Grobusch potvrdil v Rotterdam study asociaci mezi sérovým feritinem a rizikem vzniku IM (Klipstein-Grobusch 1999). Kiechl v prospektivní Bruneck study v 5ti letém sledování progresu aterosklerózy karotických tepen prokázal signifikantní korelaci s hladinou sérového feritinu ($p < 0,0001$) po adjustaci ostatních rizikových faktorů (věk pohlaví, konzumace alkoholu etc.) (Kiechl 1997). Van der A publikoval výsledky studie, které se zúčastnilo 16136 žen ve věku 49 - 70 let. Studie trvala 4 roky a autoři prokázali, že zvýšený přísun hemového železa je spojen se zvýšením rizika KVO (Van der A 2005). Konzistentní s výše uvedenými studiemi jsou i data o vztahu mezi sníženými zásobami železa a sníženým výskytem IM a kardiovaskulárních příhod. Facchini a Saylor ve své studii prováděli odběry krve 31 pacientům v jednoměsíčních nebo dvouměsíčních intervalech až se dostali těsně nad hladinu deficitu zásobního železa. Pozorovali signifikantní vzestup HDL cholesterolu, pokles LDL cholesterolu TAG, fibrinogenu a krevního tlaku ($p < 0,0001$). Po přerušení odběrů došlo k úpravě výchozích hodnot za 6 měsíců (Facchini a Saylor 2002). Podobně Van Jaarsveld prokázal, že pravidelné odběry krve po dobu 12 týdnů vedly k poklesu peroxidace LDL a zvýšení hladiny HDL cholesterolu (Van Jaarsveld 2002). Tuomainen v prospektivní studii v trvání 5,5 roku na souboru 2682 finských mužů prokázal 86% pokles IM u dárců krve v porovnání s kontrolní skupinou (0,7 vs 9,8 %, $p < 0,0001$) (Tuomainen 1997). Gaenzer prokázal zlepšení endotel-dependentní vazodilatace u pacientů s hereditární hemochromatózou po pravidelných venepunkcích (Gaenzer 2002). Další studii publikovali Zheng et al., ve které dobrovolní dárci krve s častou frekvencí odběrů měli lepší endotel-dependentní vazodilataci

v porovnání s dárci s nízkou frekvencí krevních odběrů (Zheng 2005). Drüeke demonstroval, že pokročilé produkty oxidace proteinů (AOPP) u dialyzovaných pacientů korelovaly s expozicí intravenózním preparátům železa a šířkou intimy-medie arteria carotis communis (Drüeke 2002).

Byla však publikována i řada epidemiologických studií, které nepotvrdily přímou asociaci mezi zásobami železa a vznikem kardiovaskulárního onemocnění. Magnusson neprokázal vztah mezi feritinem a rizikem vzniku IM ani náhlé srdeční smrti (prospektivní islandská studie, 990 mužů a 1046 žen, délka trvání 8,5 roku) (Magnusson 1994). V U.S. Physicians study muži se sérovým feritinem > 200 ng/ml neměli vyšší riziko vzniku IM v porovnání s kontrolní skupinou (Stampfer 1993). Ve finské studii s 206 muži ve věku 50 - 60 let Rauramaa nepotvrdil vztah mezi hladinou feritinu a aterosklerózou karotických tepen (Rauramaa 1994). Stejně tak Moore ve studii ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) neprokázal asociaci mezi feritinem a šířkou intimy arteria carotis communis (Moore 1995). Ascherio vyhodnotil příjem železa ve vztahu ke vzniku KVO v Health Professional's Follow-up Study u 44 933 mužů a neprokázal vztah mezi příjmem železa a výskytem KVO (Ascherio 1994). Prospektivní studie, která sledovala vztah mezi železem nenavázaným na transferin (NTBI) a vznikem kardiovaskulárního onemocnění u postmenopauzálních žen, neprokázala signifikantní rozdíl mezi pacientkami v nejvyšším tercilu pro NTBI a kontrolní skupinou (Van der A 2006).

I výsledky studií u hereditární hemochromatózy jsou rozporuplné. Roest publikoval práci, podle které měly postmenopauzální ženy, heterozygotky pro hereditární hemochromatózu v mutaci Cys282Tyr vyšší riziko kardiovaskulárního úmrtí (Roest 1999). Tuomainen pak prokázal u mužů středního věku, že nositelé výše uvedené mutace pro hereditární hemochromatózu mají 2,3x vyšší riziko akutního infarktu myokardu než kontrolní skupina (Tuomainen 1999). Naproti tomu Ellervik v dánské studii neprokázal zvýšené riziko KVO u genotypů spojených s hereditární hemochromatózou (Ellervik 2005). Je známo, že je u hemochromatózy snížený intracelulární obsah železa v retikuloendoteliálních buňkách. Tímto mechanismem, zprostředkovaným nízkou hladinou hepcidinu, jsou do určité míry homozygoti chráněni před aterosklerózou (Sullivan 2007). U heterozygotů je tento efekt pouze částečný (Sullivan 2001).

Ve studiích *in vitro* vedlo přidání železa ke kultuře endoteliálních buněk ke zvýšené expresi cytoadhezivních molekul endoteliemi a zvýšené adhezenci monocytů (Kartikasari 2006). Přidání chelátů železa např. desferoxaminu vede ke snížení exprese cytoadhezivních molekul i adhezence monocytů (Zhang 2003). Nasycení THP-1 buněčné linie monocytů železem mělo za následek zvýšenou expresi scavengerových receptorů na jejich povrchu a zvýšený příjem oxLDL těmito buňkami (Kraml 2005). Celá řada studií prokázala zvýšený obsah železa přímo v aterosklerotických plátech. Smith demonstroval ve své studii přítomnost katalytického železa ve vzorcích odebraných z humánních aterosklerotických lézí (Smith 1992). Depozita železa byla potvrzena nukleární mikroskopií i v aterosklerotických lézích králíků (Thong 1996) i histologicky v humánních aterosklerotických lézích (Yuan 1996, Pang 1996). V závislosti podle zvolené metody měření obsahu železa obsahují aterosklerotické léze v karotických arteriích 3x až 17x více železa v porovnání s tkání v arteriích kon-

trolních zdravých subjektů (*Stadler 2004*). V sérii studií Watta et al. byl prokázán v nově vzniklých aterosklerotických lézích králíků krmených dietou s vysokým obsahem cholesterolu až 7-násobný vzestup koncentrace železa (*Ponraj 1999, Minqin 2003, Watt 2006*). Pang et al. objevili zvýšenou expresi genů pro L-ferritin a H-ferritin humánních aterosklerotických plátech (*Pang 1996*). V jiné studii obsah železa ve vzorcích z karotických endarterektomií pozitivně koreloval s hladinou sérového feritinu (*Lapenna 2007*). Zdroj železa v plátech je předmětem výzkumu, část železa jistě pochází z mikrohemoragií (*Kolodgie 2003*). Yuan et al. popsali erytrophagocytózu jako důležitý mechanismus příjmu železa makrofágy v plátu a objevili interakci mezi železem a lipoproteiny během přeměny makrofágů v pěnové buňky (*Yuan 1996, Yuan 2004, Li 2004*). Železo obsažené v hemoglobinu z mikrovaskulárního krvácení v plátu je odstraňováno pomaleji u genotypu haptoglobin 2-2 v porovnání s genotypem haptoglobin 1-1, proto je také tento genotyp spojen se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění (*Asleh 2003*). U Apo-E deficientních myší s typem 2-haptoglobinové alely byla pozorována větší depozita železa v aterosklerotických plátech, zvýšená peroxidace lipidů a současně i větší akumulace makrofágů v plátech (*Levy 2007*). Podobně polymorfismus v promotoru genu pro enzym hemoxygenázu je spojený s vyšším výskytem aterosklerózy, protože nedochází k dostatečnému odbourávání hemu v makrofágách (*Chen 2002, Dick 2005*). Bylo zjištěno, že statiny indukují hemoxygenázu-1 v „myšších“ makrofázích (*Chen 2006*). Nabízí se tak vysvětlení, že statiny mohou stabilizovat aterosklerotické pláty indukci hemoxygenázy-1, facilitovat tak mobilizaci železa a snižovat obsah železa v plátu. Vlivem vysokých hladin hepcidinu mohou makrofágy zvýšeně akumulovat železo, které se pro ně i pro jejich okolí stává toxickým. Uvolňování železa z makrofágů zvyšuje přítomnost oxidovaných LDL částic a snižuje HDL cholesterol (*Yuan 2004*). Zánik makrofágu nasyceného železem vede k uvolnění toxického železa do plátu, poškození okolních buněk a přitažení dalších monocytů do nestabilní léze. Patologické konsekvence může mít rovněž na hepcidinu závislé zvýšení obsahu železa v ostatních vaskulárních buňkách exprimujících ferroporin např. endoteliálních buňkách (*Nanami 2005*). V případě endotelií může železo fungovat jako regulátor vaskulární reaktivity (*Sullivan 2005, Duffy 2001, Zheng 2005*).

Objevy ve studiích se zvířaty potvrzují, že je možná mobilizace železa obsaženého v makrofázích aterosklerotických plátů pomocí diety s nízkým obsahem železa, odběry krve i podáváním chelátů. U Apo-E deficientních myší došlo v souvislosti s restrikcí příjmu železa k významnému zmenšení aterosklerotických plátů a jejich větší stabilitě, stejně tak se snížila hladina protilátek proti oxidovaným LDL (*Lee 1999, Lee 2003*). Podávání chelátů železa zvířatům zabránilo iniciaci a progresi aterosklerotických lézí a zlepšilo endoteliální funkci (*Minqin 2005, Ishizaka 2005*). Předávkování železem u králíků i potkanů způsobilo akceleraci aterosklerózy (*Araujo 1995, Ishizaka 2002*).

Multicentrická randomizovaná, dvojitě slepá studie FeAST, zahrnující celkem 1277 pacientů se symptomatickou aterosklerózou periferních tepen v průměrném věku 67 let a průměrnou dobou sledování 4,5 roku neprokázala významný vliv pravidelných odběrů krve na celkovou mortalitu ani na výskyt infarktu myokardu nebo mozkové příhody (*Zacharski 2007*). Nicméně subanalýza pacientů ve věku 43 - 61 let prokázala

signifikantní redukci mortality i výskytu IM a CMP v této skupině, tj. 54% redukci celkové mortality ($p=0,019$) spolu s 57% redukcí úmrtí + nefatálního infarktu myokardu a mozkové příhody ($p<0,001$). Celkově byla dosažena redukce hladiny feritinu z průměrné vstupní hodnoty 122,5 ng/ml na 79,7 ng/ml tj. 35% pokles.

Tato studie však přinesla více otázek než odpovědí. Rekrutovaný soubor pacientů byl menší než autoři původně plánovali, byla také vyšší nespolupráce pacientů než se očekávalo a studie byla sekundárně preventivní, protože pacienti měli již pokročilé onemocnění periferních tepen.

I soubor mladších jedinců je malý na vyvozování jednoznačných závěrů. Zdá se, že z redukce zásobního železa by mohli profitovat mladší jedinci. K potvrzení této hypotézy by však bylo nutné doplnit novou prospektivní studii s větším souborem a delším trváním. Zároveň není známá cílová hladina hepcidinu, která je spojená s relokací železa makrofágů v plátech do erytroidních prekurzorů. V určitých stádiích progresu aterosklerotického plátu dochází k zvýšené syntéze IL-6 (*Ridker 2000, De Palma 2003*), který zvyšuje produkci hepcidinu. Ten pak zvyšuje intracelulární obsah železa v makrofázích a pozitivní zpětnou vazbou posiluje zánětlivou odpověď.

Studie FeAST přinesla nepřímý důkaz o zvýšené produkci IL-6 ve spojení s aterosklerotickým plátem (*Zacharski 2007*). Probandi ve studii FeAST měli na začátku studie vyšší hladiny IL-6 a IL-6 koreloval pozitivně s hladinou feritinu. Hladina IL-6 se však na rozdíl od hladiny feritinu v celém souboru po opakovaných odběrech krve nesnížila (nedostatečná redukce zásobního železa?). Nicméně u nejvyššího kvartilu poklesl po 12 měsících IL-6 z průměrných 57 pg/ml na 13 pg/ml ($p=0,03$). Přesto nebylo dosaženo hodnoty jako u zdravých kontrol. Snížením zásob železa tedy lze ovlivnit hladinu IL-6 v organismu. Ve studii Physicians Health Study byla prokázána pozitivní korelace mezi basální hladinou IL-6 a rizikem rozvoje IM (*Ridker 2000*). Jakým mechanismem IL-6 zvyšuje riziko IM není zcela jasné. Jedním z možných mechanismů je právě indukce hepcidinu.

2. VLASTNÍ PRÁCE

Výše uvedené studie poukazují na vztah mezi zvýšenými zásobami železa a tvorbou volných kyslíkových radikálů, které poškozují endotel a způsobují oxidaci lipoproteinů o nízké denzitě. Poškození endotelu navozuje zánětlivou odpověď s průnikem makrofágů do cévní stěny a jejich následnou přeměnu v pěnovou buňku. Zvýšené endogenní zásoby železa se tímto mechanismem mohou podílet na aterosklerotickém procesu jak v jeho iniciálním stádiu, tak i během progresu aterosklerotického plátu. Podobně se železo může podílet na rozvoji inzulínové rezistence s následnou hyperglykemií a akcelerací aterosklerotického procesu v důsledku neenzymatické glykosylace proteinů a lipidů v arteriální stěně, oxidačním stresem a aktivací protein-kinázy C. Na rozdíl od studií *in vitro* či na zvířecím modelu jsou klinické studie ve svých výsledcích nejednoznačné. V naší pilotní klinické studii, která prokázala pozitivní asociaci mezi poruchou endotel-dependentní vazodilatace a hyperlipoproteinémií (*publikováno ve Physiological Research 2004*), jsme v provedené subanalýze pozorovali vztah mezi endogenními zásobami železa a endotel-dependentní vazodilatací (subanalýza je uvedena v následujícím textu). Na základě této subanalýzy z širší populační studie, jsme se rozhodli zaměřit můj postgraduální výzkum na hodnocení vztahu endogenních zásob železa jako rizikového faktoru aterosklerózy. Naší cílovou skupinou byli asymptomatictí neléčení muži ve středním věku v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Je známo, že muži ve středním věku mají vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění v porovnání se stejnou věkovou kategorií žen. Jedno z vysvětlení navrhuje právě takzvaná „Iron-heart“ hypotéza publikovaná Sullivanem, která předpokládá nižší incidenci ischemické choroby srdeční u premenopauzálních žen v porovnání se stejnou věkovou kategorií mužů z důvodu pravidelných krevních ztrát menstruací a tím i nižších endogenních zásob železa. Zdá se, že vliv zvýšených endogenních zásob železa může být klíčový právě v iniciálních stádiích aterosklerotického procesu u mladších pacientů v primární prevenci spíše než u starších jedinců s pokročilým aterosklerotickým postižením tepen, kteří z redukce zásob železa a režimových opatření profitují méně. Cílem práce bylo prokázat asociaci mezi endogenními zásobami železa, oxidačním stresem, porušenou inzulínovou senzitivitou a aterosklerotickým procesem před jeho klinickou manifestací právě u zdravých jedinců.

2.1. Pilotní studie – Endogenní zásoby železa a endotelová dysfunkce

Úvod:

Endotelová dysfunkce má úzký vztah k patogenezi aterosklerózy. Manifestuje se již v iniciační fázi jako časný ukazatel aterosklerotického postižení. U pokročilých lézí je markerem nestability aterosklerotického plátu. Možnou neinvazivní sonografickou metodou zjišťování endotelové dysfunkce je měření vasodilatační odpovědi na arteria brachialis – endotel-dependentní vazodilatace (EDV) (*Sorensen 1995, Celermajer 1998*). Tato meto-

da je založená na uvolňování vazodilatačního faktoru – NO z endotelií v důsledku jejich mechanického podráždění obnoveným krevním proudem po předchozí přechodné (4-minutové) ischemii končetiny. Bylo prokázáno, že jedinci primární prevence se závažnými rizikovými faktory (hypercholesterolemie, kouření, diabetes) vykazují poruchu EDV (Celermajer 1998). Je také známo, že porucha EDV měřená na arteria brachialis přímo koreluje s mírou aterosklerotického postižení koronárního řečiště (Anderson 1995).

Hypotéza:

Osoby s definovanými vysokými endogenními zásobami železa v organizmu budou ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovat nižší hodnoty endotel-dependentní vazodilatace na arteria brachialis a to nezávisle na závažných rizikových faktorech jako je hypertenze, hyperlipoproteinémie, kouření či mužské pohlaví.

Metodika:

V rámci naší studie bylo vyšetřeno 189 respondentů ve věku 45 - 65 let. Z nich byla nedefinována skupina jedinců s vysokými endogenními zásobami železa na základě poměru transferinový receptor/feritin (TfR/F) < 11 a zároveň hladina hemoglobinu > 145 g/l. Tuto skupinu tvořilo 37 jedinců (průměrný věk 54,74 ± 4,47 let). Kontrolní skupinu s nízkými endogenními zásobami železa tvořili jedinci, u nichž poměr transferinový receptor/feritin (TfR/F) byl roven a vyšší než 11 a hemoglobin roven a nižší než 145 g/l. Skupinu s nízkými zásobami železa tvořilo 45 jedinců (průměrný věk 53,90 ± 4,85 let; p=0,571) (Tabulka 1). Přehled ostatních měřených parametrů uvádí tabulka 2.

Tabulka 3 udává zastoupení podle pohlaví v jednotlivých skupinách a přehled manifestace aterosklerotických onemocnění (ICHS, ICHDK, CMP), hypertenze, diabetes mellitus, chronických zánětlivých onemocnění a kouření ve skupinách s nízkými a vysokými zásobami železa.

Tabulka 1: Rozložení souboru s nízkými a vysokými endogenními zásobami železa podle výběrových kritérií

Srovnávané parametry	vysoké zásoby železa			nízké zásoby železa		
	n	x	SD	n	x	SD
Feritin (ng/ml)	37	274,16	50,719	45	48,87	19,009
Transferin (g/l)	37	2,34	0,120	43	2,61	0,201
Transferinové receptory (mg/l)	37	1,51	0,223	45	2,25	0,493
Poměr Transfer.rec./Feritin	37	5,50	0,951	45	46,03	21,724
Erytrocyty (x 10¹²/l)	37	4,93	0,138	45	4,46	0,129
Hemoglobin (g/dl)	37	15,63	0,328	45	13,52	0,365
Hematokrit (%)	37	45,50	0,864	45	39,45	1,420

Tabulka 2: Základní charakteristika souboru s nízkými a vysokými endogenními zásobami železa

Srovnávané parametry	vysoké zásoby železa			nízké zásoby železa			p
	n	x	SD	n	x	SD	
Věk (roky)	37	54,74	4,478	45	53,90	4,855	0,5717
BMI (kg/m ²)	36	28,24	3,392	43	26,99	4,404	0,1653
WHR (pas/boky)	35	0,97	0,062	42	0,86	0,105	0,0000
STK (mmHg)	37	134,89	17,646	44	134,91	22,475	0,9924
DTK (mmHg)	37	80,84	7,463	44	81,89	9,475	0,5936
Celkový cholesterol (mmol/l)	37	5,36	0,461	45	5,64	0,468	0,2526
Triacylglyceroly (mmol/l)	36	1,73	0,362	45	1,28	0,256	0,0055
HDL cholesterol (mmol/l)	36	1,24	0,138	44	1,47	0,187	0,0062
LDL cholesterol (mmol/l)	35	3,23	0,375	44	3,40	0,418	0,5635
Glykémie (mmol/l)	36	5,62	0,455	45	5,55	0,422	0,7533
Kyselina močová (μmol/l)	37	347,54	30,931	45	256,45	33,338	0,0000

Tabulka 3: Přehled zastoupení rizikových faktorů ve skupinách podle endogenních zásob železa

Pohlaví			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
Muži	35	11	46
Ženy	2	34	36
X ²	40,57		
p	0,0000		

Koronarograficky prokázaná ICHS			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	19	33	52
ANO	18	12	30
X ²	4,23		
p	0,0397		

Hypertenze			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	19	28	47
ANO	18	17	35
X ²	0,98		
p	0,3220		

ICHDK			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	36	43	79
ANO	1	2	3
X ²	0,17		
p	0,3759		

Diabetes mellitus			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	32	38	70
ANO	5	7	12
X ²	0,07		
p	0,7946		

Centrální mozková příhoda			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	36	44	80
ANO	1	1	2
X ²	0,02		
p	0,8884		

Chronická zámětlivá onemocnění			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	30	39	69
ANO	7	6	13
X ²	0,47		
p	0,4908		

Kouření			
	↑ Fe	↓ Fe	Celkem
NE	21	37	58
ANO	16	8	24
X ²	6,36		
p	0,0117		

Všichni vyšetřovaní jedinci se dostavili ráno nalačno (bylo požadováno minimálně 10 hodin lačnění před vyšetřením). Léčení pacienti byli požádáni vzít si své ranní léky s sebou a užít je až po sonografickém vyšetření dilatace na arteria brachialis (EDV) a odběru krve.

Každý respondent se nejprve podrobil duplexnímu sonografickému vyšetření karotických tepen a vyšetření endotel-dependentní vazodilatace na arteria brachialis. Poté bylo každému jedinci odebráno cca 20 ml krve na laboratorní analýzy. Od každého respondenta byla odebrána podrobná osobní, rodinná, sociální a pracovní anamnéza se zvláštním důrazem na kardiovaskulární onemocnění a jejich rizikové faktory. Krevní tlak

byl měřen vsedě na pravé paži po 10 minutách klidu. Antropometrické měření zahrnovalo stanovení výšky, váhy a měření obvodu pasu a boků. Poté následovalo kompletní interní fyzikální vyšetření.

Měření endotel-dependentní vazodilatace (EDV) jsme prováděli metodou podle Celermajera a spolupracovníků (*Celermajer 1998, Sorensen 1995*). Metoda je založená na uvolnění vasodilatačních faktorů (NO) z endotelových buněk při obnovení průtoku ve vyšetřované tepně. Každému jedinci byl po 10 minutách klidu vleže změřen krevní tlak na levé pažní tepně, podle kterého pak byla stanovena výše tlaku v zaškrcení, tj. o 60 mmHg více, než naměřená hodnota systolického tlaku. Měření EDV probíhalo na pravé arteria brachialis. Sonograficky bylo lokalizováno vhodné místo na vyšetřované tepně a byl snímán videozáznam po dobu 60ti sekund. Poté bylo provedeno zaškrcení pravého předloktí manžetou tonometru na dobu 4 minut. Po vypuštění manžety tonometru byl snímán videozáznam ještě po dobu další 1 minuty.

Vyhodnocení endotel-dependentní vazodilatace bylo provedeno z přehraného videozáznamu pomocí speciálního software ImagePro (Obrázek 1). Samotné měření probíhalo také za standardních podmínek. Ve fázi před zaškrcením bylo sestříháno 10 snímků tepny v 10ti po sobě následujících diastolách, ve fázi po zaškrcení tepny bylo v časovém úseku 30. - 45. sekunda po vypuštění manžety stejným způsobem sestříháno 10 snímků. Ve zvoleném místě byl na každém ze sestříhaných snímků s přesností na setinu milimetru změřen diametr tepny a ten byl zprůměrován pro všech 10 měření před a po zaškrcení.

Z obou průměrů bylo vypočteno o kolik procent původního průměru se tepna po obnovení průtoku v daném místě dilatovala. Tuto hodnotu jsme označili EDV a následně porovnávali s ostatními měřenými veličinami.

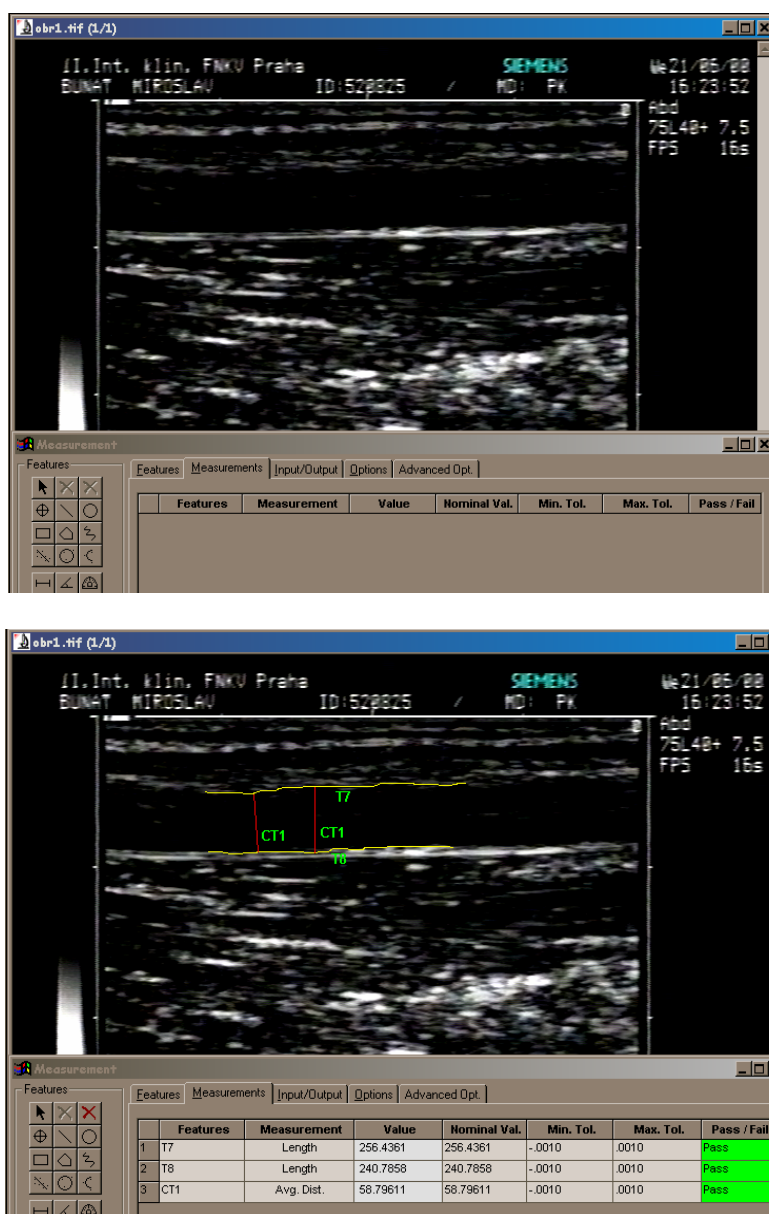
K měření šířky intimy-medie společné karotické tepny (IACC) bylo použito duplexní sonografie přístrojem Sonoline Siemens s lineární sondou 7,5 MHz (*Gnasso 1996*). U pacienta v klidu vleže byla vždy nalezena bifurkace karotid a v úseku 1 - 2 cm distálně od ní (na stěně vzdálenější od sondy) byla vždy jedním vyšetřujícím měřena šířka intimy a to vždy na 10ti místech ve zmíněném úseku a hodnoty z obou stran byly zprůměrovány. Hodnota IACC používaná jako ukazatel míry aterosklerotických změn v karotickém řečišti byla tedy průměrem 20ti dílčích měření.

Výsledek vyšetření EDV a IACC může být výrazným způsobem zatížen subjektivně. Proto byla obě měření prováděna pouze jedním vyšetřujícím. Studie byla zaslepena v tom smyslu, že vyšetřující v době měření a vyhodnocování obou sonografických nálezů nevěděl, do jaké skupiny vyšetřovaných osob daný jedinec náleží, neboť odběr krve, fyzikální vyšetření a získávání anamnestických dat následovaly až po sonografickém vyšetření.

V naší studii jsme použili jako laboratorní ukazatel fyziologické funkce endotelu měření nitritů a nitrátů v plazmě. Jedná se o oxidační produkty kyslíčnicku dusnatého (NO), produkovaného endotelem za fyziolo-

gických podmínek. Metoda je založená na enzymové redukci nitrátů nitrátoreduktázou a následným stanovením nitritů Griessovou reakcí se sulfonamidem a naftylendiaminem s ultrafiltrační deproteinací vzorků (Crkovská 1998). Protilátky proti oxidovaným LDL (anti-oxLDL) byly stanovovány metodou enzymové imunoanalýzy kitem BIOMEDICA, Rakousko. Oxidované LDL (oxLDL) byly stanovovány rovněž přímo z plazmy metodou enzymové imunoanalýzy kitem MERCODIA AB, Švédsko. Lipofilní vitamíny A a E v plazmě byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) metodou popsanou v publikaci (Fojtíková 1991).

Obrázek 1: Vyhodnocování EDV v počítači



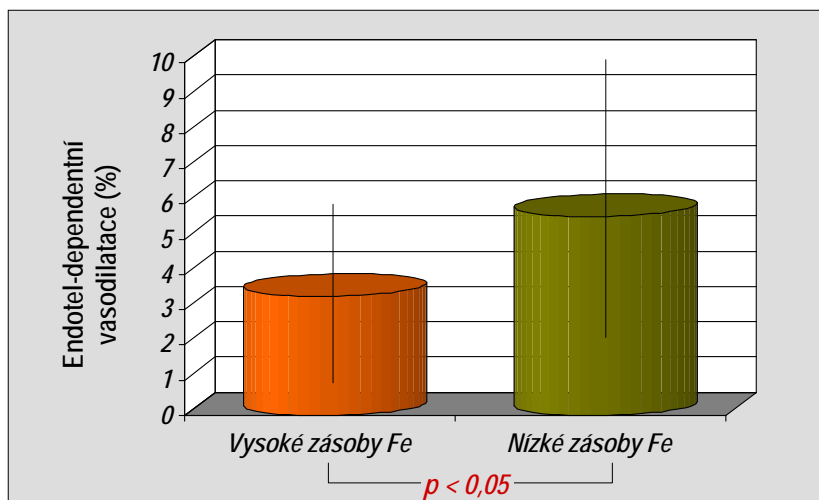
Výsledky:

Srovnání jedinců s vysokými a nízkými endogenními zásobami železa v námi měřených parametrech ukazuje tabulka 4. Jedinci s vysokými zásobami železa vykazují významně horší hodnoty endotel-dependentní vazodilatace než osoby s nízkými zásobami ($p=0,0218$). Jedinci s vysokými zásobami železa měli též signifikantně vyšší průměrné hodnoty WHR ($p=0,0000$), oxLDL (korigovaného na LDL-C) ($p=0,0167$), retinolu ($p=0,0299$), homocysteinu ($p=0,0028$), triacylglycerolů ($p=0,0055$), ALT ($p=0,0004$) a AST ($p=0,0075$). Naopak HDL cholesterol ($p=0,0062$) a poměr HDL cholesterol/LDL cholesterol (ATI) byl u jedinců s vysokým zásobním železem signifikantně nižší, než u osob s nízkými zásobami ($p=0,0452$).

Tabulka 4: Srovnání souboru jedinců s nízkými a vysokými zásobami železa v organizmu

Srovnávané parametry	vysoké zásoby železa			nízké zásoby železa			p
	n	x	SD	n	x	SD	
Endotel depend. vasodil. (%)	28	3,38	2,497	33	5,64	4,062	0,0218
IACC (mm)	37	0,65	0,196	44	0,56	0,118	0,0581
OxLDL (U/l)	28	62,37	10,978	32	56,89	7,395	0,3119
Anti-oxLDL (mU/ml)	34	335,74	123,216	43	230,67	83,274	0,0521
Nitry/nitráty ($\mu\text{mol/l}$)	37	17,82	3,921	45	23,12	6,751	0,0511
Retinol ($\mu\text{g/ml}$)	37	0,73	0,099	45	0,64	0,075	0,0299
Tokoferol ($\mu\text{g/ml}$)	37	10,52	1,252	45	10,96	0,844	0,2366
Homocystein ($\mu\text{mol/l}$)	34	12,11	1,332	39	10,21	0,939	0,0028
Isoprostany (pg/ml)	11	98,40	24,502	9	116,68	30,920	0,5337
Malondialdehyd ($\mu\text{mol/l}$)	10	0,85	0,073	12	0,79	0,071	0,5015
PAPP (mU/l)	27	8,83	1,069	24	7,73	0,757	0,0694
C reaktivní protein (mg/l)	37	7,85	1,594	45	7,35	1,050	0,9368
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	37	0,60	0,150	45	0,37	0,082	0,0004
AST ($\mu\text{kat/l}$)	37	0,52	0,088	45	0,42	0,054	0,0075
Leukocyty ($\times 10^9/l$)	37	6,62	0,682	45	5,70	0,610	0,0071
FW /1 hod.	37	7,59	2,632	41	11,99	3,946	0,0109
poměr oxLDL/LDL	27	20,18	3,330	31	17,46	1,973	0,0167

Graf 1: Srovnání endotel-dependentní vazodilatace u jedinců s vysokými resp. nízkými zásobami železa



Tabulka 5 ukazuje korelaci kvalitativního znaku endogenních zásob železa se sledovanými parametry. Z tabulky vyplývá, že zvýšené zásobní železo koreluje pozitivně s oxLDL ($p < 0,05$), WHR ($p < 0,01$), IACC ($p < 0,05$), retinolem ($p < 0,05$), homocysteinem ($p < 0,01$), triacylglyceroly ($p < 0,01$), počtem leukocytů i erytrocytů, středním objemem erytrocytu, plazmatickými koncentracemi kyseliny močové a kreatininu, hodnotami ALT, AST a GMT (vše $p < 0,01$). Naopak negativní korelaci jsme pozorovali u endotel-dependentní vazodilatace ($p < 0,05$), HDL cholesterolu ($p < 0,01$), ATI ($p < 0,05$) a FW/1h ($p < 0,05$). Vysoké endogenní zásoby železa korelují samozřejmě významně s pohlavím (u mužů vyšší zásoby železa) a kouřením (u kuřáků vyšší zásoby železa).

Tabulka 5: Korelace znaku „vysoké endogenní zásoby železa“ se sledovanými parametry v celém souboru

Proměnná	n	r	P	Proměnná	n	r	p
Věk	82	0,09	NS	Isoprostany	20	-0,19	NS
Pohlaví	82	-0,70	< 0,01	MDA	22	0,14	NS
BMI	79	0,16	NS	PAPP	51	0,26	NS
WHR	77	0,53	< 0,01	Celkový chol.	82	-0,12	NS
STK	81	-0,00	NS	Triacylglyceroly	81	0,30	< 0,01
DTK	81	-0,06	NS	HDL cholesterol	80	-0,31	< 0,01
Hypertenze v OA	82	0,11	NS	LDL cholesterol	79	-0,10	NS
Kouření v OA	82	-0,28	< 0,01	ATI	80	-0,25	< 0,05
Alkohol v OA	82	0,43	< 0,01	Leukocyty	82	0,30	< 0,01
Chronické záněty	82	0,08	NS	Erytrocyty	82	0,63	< 0,01
Hyperlipoproteinémie	81	0,07	NS	MCV	81	0,38	< 0,01
Diabetes mellitus	82	-0,03	NS	Bilirubin	82	0,13	NS
IACC	81	0,26	< 0,05	FW/1h	78	-0,24	< 0,05
EDV	61	-0,29	< 0,05	C reaktivní protein	82	0,12	NS
OxLDL *	58	0,28	< 0,05	Kyselina močová	82	0,46	< 0,01
Anti-oxLDL	77	0,17	NS	Kreatinin	82	0,38	< 0,01
Nitry/nitráty	82	-0,21	NS	Glykemie	81	0,04	NS
Retinol	82	0,27	< 0,05	ALT	82	0,34	< 0,01
Tokoferol	82	-0,04	NS	AST	82	0,28	< 0,01
Homocystein	73	0,36	< 0,01	GMT	82	0,33	< 0,01

* oxLDL vztaženo na hodnoty LDL cholesterolu

EDV, hyperlipidémie a železo: V naší studii jsme dále zjistili, že pacienti s definovanou hyperlipoproteinémií (non HDL-cholesterol $> 4,1$ mmol/l a/nebo TG $> 2,5$ mmol/l) mají významně horší hodnoty EDV než normolipidemičtí jedinci (Tabulka 6). Z tabulky vyplývá, že pacienti s hyperlipoproteinémií mají mj. i nižší hodnoty Tfr/F (i když rozdíl v tomto případě nedosáhl statistické významnosti). Pokusili jsme se proto v další subanalýze zjistit, jak se tyto 2 rizikové faktory vzájemně potencují ve svém vlivu na EDV.

Tabulka 6: Srovnání sledovaných parametrů u pacientů s hyperlipoproteinémií a skupiny kontrol

Srovnávané parametry	Pacienti s hyperlipoproteinémií			Normolipidemičtí			p
	n	x	SD	n	x	SD	
EDV (%)	109	4,13	3,068	42	5,41	3,822	0,0316
IACC (mm)	134	0,68	0,220	53	0,58	0,148	0,0053
Nitry/nitráty ($\mu\text{mol/l}$)	131	20,42	4,880	51	16,37	4,436	0,0184
Malondialdehyd ($\mu\text{mol/l}$)	31	0,89	0,092	16	0,73	0,082	0,0096
CRP (mg/l)	134	8,15	1,678	54	7,06	1,208	0,0497
Feritin (ng/ml)	132	126,18	49,716	53	102,09	46,146	0,1647
Tfr/F	83	0,01	0,006	30	0,02	0,012	0,0830

Tabulka 7 srovnává EDV u pacientů s vysokým a nízkým zásobním železem, a to jak v podskupině hyperlipidemiků (HL+), tak i normolipidemiků (HL-). V první podskupině se EDV mezi jedinci s vysokým a nízkým zásobním železem významně nelišily. V podskupině normolipidemiků jsme však zaznamenali významný rozdíl v EDV podle zásob železa ($p < 0,01$).

Tabulka 7: **Srovnání EDV u hyperlipidemiků a normolipidemiků podle hladin zásobního železa**

	n	x	SD	Duncanův test			
				HL+ ↑ Fe	HL+ ↓ Fe	HL- ↑ Fe	HL- ↓ Fe
HL+ ↑ Fe	18	3,92	2,594		$p = 0,5561$	$p = 0,3910$	$p = 0,0297$
HL+ ↓ Fe	19	4,68	3,503	$p = 0,5561$		$p = 0,1747$	$p = 0,0860$
HL- ↑ Fe	9	2,80	2,387	$p = 0,3910$	$p = 0,1747$		$p = 0,0039$
HL- ↓ Fe	14	6,95	4,521	$p = 0,0297$	$p = 0,0860$	$p = 0,0039$	

Diskuze:

V naší studii jsme prokázali, že jedinci s vysokými endogenními zásobami železa v organizmu mají horší vazodilatační odpověď endotelu, podmíněnou obnovením krevního proudu v arteria brachialis. Při regresní analýze se pak jasně ukazuje, že endogenní zásoby železa pozitivně korelují s šířkou intimy-medie společné karotické tepny. Z uvedeného vyplývá, že vysoké endogenní zásoby železa mají zásadní vztah k dysfunkci endotelu a zároveň i k ukazateli pokročilosti aterosklerotického procesu. Oba ukazatele (EDV i IACC) však spolu korelovat nemusí, neboť i poměrně pokročilý aterosklerotický plát může být po stabilizaci kryt funkčním endotelem. Také v naší studii byl rozdíl v IACC mezi skupinami s vysokými a nízkými zásobami železa pouze na hranici 5 % statistické významnosti. Dle fyziologické distribuce železa v závislosti na pohlaví je jasné, že i v této studii ve skupině jedinců s vysokými zásobami železa převažovali významně muži a naopak ve skupině s nízkými zásobami železa ženy.

Aby v našem sdělení nezůstal skryt vztah endotel-dependentní vazodilatace k endogenním zásobám železa za vlivem pohlaví, provedli jsme subanalýzu na párových dvojicích muž – žena ve stejném věku se shodným parametrem endogenních zásob (poměr transferinový receptor/feritin). Pro výše zmíněnou logickou fyziologickou pohlavně podmíněnou distribuci železa se v celém souboru podařilo utvořit pouze 22 párů. Endotel-dependentní vazodilatace při stejných endogenních zásobách železa hodnocená párovým t-testem se u mužů nikterak nelišila od žen ($t=0,9062$; $p > 0,05$). Nedomníváme se tedy, že by pohlaví mělo na vazodilataci přímý vliv, ale naopak se zdá, že i za statisticky významnou korelaci endotel-dependentní vazodilatace s pohlavím se skrývá právě pohlavím předurčená distribuce endogenních zásob železa.

Jedinci s vysokými zásobami železa měli též významně vyšší hodnoty plazmatických hladin retinolu, homocysteinu a kyseliny močové. Tato skutečnost by mohla souviset s vyšší spotřebou masa a masných výrobků. V naší studii korelovaly vyšší zásoby železa též s ukazateli obezity a z ní plynoucími odchylkami ve spektru

plazmatických lipidů (pozitivní korelace s triacylglyceroly a negativní korelace s HDL cholesterolem a poměrem ATI). Toto pozorování je ve shodě s dříve publikovanými studiemi, kdy hodnoty plazmatického feritinu korelovaly s ukazateli metabolického syndromu inzulínové rezistence (*Williams 2002, Hsueh 2003*).

V celém souboru vyšetřených jedinců koreluje EDV negativně s hodnotou feritinu a parametry červeného krevního obrazu. Feritin jako jeden z proteinů akutní fáze však může být zvýšen, jak bylo uvedeno v úvodu, např. z důvodů akutního či chronického zánětu, či obecně v akutních stavech (*Williams 2002*). Jelikož však nebyla pozorována závislost EDV na CRP ani na hodnotách FW/1h, FW/2h, považujeme korelaci s feritinem spíše jako důsledek endogenních zásob železa.

Pozitivní korelaci zásob železa s ALT, AST a GMT, tzn. s ukazateli hepatocelulárního poškození, si vysvětlujeme cytotoxickým efektem železa na jaterní buňku (*Gaenger 2002*). Na druhé straně korelace zásob železa s alkoholem, která vychází z našich pozorování, by mohlo mít vztah k toxickému efektu alkoholu na hepatocyt a následným uvolněním feritinu z poškozených buněk.

Při analýze jednotlivých rizikových faktorů aterosklerózy jsme si povšimli i pozitivní korelace zásob železa jak s EDV, tak s kouřením. Abychom potvrdili, že vysoké endogenní zásoby železa mají na EDV vliv nezávisle na parametru kouření, provedli jsme další subanalýzu EDV párovým *t*-testem kuřák – nekuřák ve stejném věku a se stejným zastoupením pohlaví (28 párů). Takto vzniklé skupiny kuřáků a nekuřáků se v parametru EDV statisticky významně nelišily ($t=0,2368$; $p>0,05$). Vliv endogenních zásob železa a kouření na EDV považujeme proto za dva na sobě nezávislé faktory zhoršující endotel-dependentní vazodilataci.

Pacienti s vyššími zásobami železa vykazovali nižší plazmatické koncentrace nitritů/nitrátů ve srovnání s kontrolní skupinou ($p=0,05$). Domníváme se, že nižší hodnoty nitritů/nitrátů byly způsobeny poruchou funkce endotelových buněk. Nižší hodnoty nitritů/nitrátů v souvislosti s oxidačním stresem byly popsány v minulosti i dalšími autory (*Vanizor 2001*). Z uvedeného lze soudit, že hyperlipoproteinémie sama o sobě velmi silně ovlivňuje EDV. Přesto po odbourání jejího vlivu zásobní železo zůstává významným faktorem způsobujícím poruchu endotel-dependentní vazodilatace.

2.2. HYPOTÉZY

Na základě výsledků výše uvedené širší populační studie jsme provedli dvě následující studie na kohortách zdravých mužů primární prevence.

2.2.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence

V epidemiologických studiích byla nalezena asociace mezi vysokými endogenními zásobami železa v organizmu a inzulínovou rezistencí u diabetes mellitus 2. typu (*Dandona 1983*). Podobně experimentální práce se zvířaty prokázaly, že snížené zásoby železa zlepšují inzulínovou senzitivitu (*Borel 1993, Farrell 1988*). Vysoké endogenní zásoby železa mají vztah k obezitě (*Ford 1999*) a jsou rovněž jednou z komponent metabolického syndromu (*Vari 2007*). Asociace mezi zvýšenou akumulací železa v játrech a metabolickými abnormalitami byla poprvé označena Mendlerem jako syndrom přetížení jaterním železem asociovaný s inzulínovou rezistencí (insulin resistance associated hepatic iron overload syndrome – IR-HIO) (*Mendler 1999*). Vztah mezi zvýšenou akumulací železa v játrech a inzulínovou rezistencí potvrdily i další studie (*Fernandez-Real et Lopez-Bermejo Ricart 2002*). V kosterním svalu může v důsledku nadbytku železa docházet k inhibici translokace glukózových transportérů GLUT 1 a 4 a naopak po depleci železa ke zvýšení jejich aktivity (*Potashnik 1995*). Zvýšené zásoby železa ve svalu mohou usnadňovat oxidaci volných mastných kyselin a tak interferovat s metabolismem glukózy. Podobně může železo ovlivňovat účinek inzulínu v adipocytech ovlivněním transportu glukózy nezávisle na mastných kyselinách (*Green 2006*). Nadbytek železa v organizmu může mít také za následek ukládání železa přímo do pankreatických β -buněk resultující v poruchu inzulínové sekrece (*Wilson 2003*). Kauzalitu ve prospěch železa potvrzují i nálezy vyšší prevalence diabetes mellitus 2. typu u hemochromatózy a také nálezy z experimentálních studií, kdy parenterální aplikace železa zvířatům vedla k rozvoji DM 2. typu (*Awai 1979*).

Hypotéza 1: Zvýšená hladina plazmatického feritinu bude asociována s abdominální obezitou, zvýšeným příjmem červeného masa a nižší fyzickou aktivitou.

Hypotéza 2: Zvýšená hladina plazmatického feritinu bude korelovat s parametry oxidačního stresu.

Hypotéza 3: Zvýšené endogenní zásoby železa, hodnocené hladinou plazmatického feritinu, budou nezávisle korelovat s inzulínovou rezistencí v souboru zdravých mužů primární prevence kardiovaskulárního onemocnění.

2.2.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické postižení karotických tepen

Přímá souvislost mezi zvýšenými endogenními zásobami železa, progresí aterosklerózy a zvýšeným rizikem rozvoje kardiovaskulárního onemocnění zůstává kontroverzní. Hypotézu o vztahu ischemické choroby srdeční a železa „Iron-heart hypothesis“ poprvé publikoval Sullivan v roce 1981 (Sullivan 1981). Předpokládal, že nižší incidence ischemické choroby srdeční u žen v produktivním věku v porovnání se stejně starými muži, souvisí s pravidelnými menstruačními krevními ztrátami a tím i nižším množstvím endogenního železa. Někteří autoři prokázali vztah mezi endogenními zásobami železa (vyjádřeno hladinou feritinu) a rizikem infarktu myokardu nebo aterosklerózou karotických tepen (Salonen 1992, Kiechl 1997, Tuomainen 1997), jiní tuto souvislost naopak nenalezli (Ascherio 1994, Stampfer 1993, Moore 1995). Na těchto inkonzistentních výsledcích se může podílet fakt, že feritin, jako protein akutní fáze, bývá zvýšen při zánětu a obezitě. Proto jsme v naší studii využili pro hodnocení endogenních zásob železa poměru koncentrace plazmatických cirkulujících transferinových receptorů a plazmatické koncentrace feritinu (TfR/F) (Tuomainen 1998). Tento poměr TfR/F by na rozdíl od feritinu neměl být ovlivněn abdominální obezitou a zánětem. Ve vztahu k metabolismu železa jsme dále stanovovali expresi transferinových receptorů (CD71) přímo na povrchu monocytů cirkulujících v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie a také sérové hladiny makrofágového scavengerového receptoru pro hemoglobin CD163.

Hypotéza 1: V souboru asymptomatických dosud neléčených mužů primární prevence budou zvýšené endogenní zásoby železa, hodnoceno poměrem koncentrace plazmatických cirkulujících transferinových receptorů a plazmatické koncentrace feritinu (TfR/F), pozitivně asociovány se šířkou intimy-medie společné karotické tepny nezávisle na tradičních rizikových faktorech aterosklerózy.

Hypotéza 2: Muži s nejnižší expresí transferinových receptorů na povrchu monocytů v periferní krvi budou vykazovat větší šířku intimy-medie a nižší poddajnost společné karotické tepny v porovnání s muži s nejvyšší expresí transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů.

Hypotéza 3: Sérové hladiny makrofágového hemoglobinu scavengerového receptoru CD163 budou pozitivně asociovány se zvýšenými endogenními zásobami železa, hodnoceno poměrem koncentrace plazmatických cirkulujících transferinových receptorů a plazmatické koncentrace feritinu (TfR/F).

2.3. PACIENTI A METODY

2.3.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence

Do studie bylo zahrnuto celkem 171 dobrovolníků, kteří odpověděli na náš inzerát ve volně dostupných novinách v pražském metru, který jim nabízel preventivní zdravotní prohlídku. Všichni byli zdraví muži ve věku 35 - 60 let, bez předchozí anamnézy kardiovaskulárního onemocnění. Všichni respondenti podepsali informovaný souhlas se studií schválený Etickou komisí 3. lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Praze. Celkem dvacet mužů bylo ze studie vyloučeno, protože nesplnili vstupní kritéria. Důvodem byla anamnéza kardiovaskulárního onemocnění, systémového onemocnění, abusus alkoholu či drog, akutní nebo chronické závažné onemocnění. Žádný z dobrovolníků neužíval pravidelně léky ani vitaminové přípravky. U všech byla odebrána pečlivě anamnéza se zaměřením na rizikové faktory aterosklerózy, příjem masa, fyzickou aktivitu a dárcovství krve. Kuřáci byli definováni jako osoby kouřící alespoň jednu cigaretu denně. Podle míry sportovní aktivity byli rozděleni do třech skupin: sport více jak 3x týdně, 1 až 3x týdně nebo méně jak 1x týdně. Podle frekvence konzumace masa (100 g/porce) pak byli dále rozděleni do pěti skupin: vegetariáni, 1-2 porce týdně, 1 porce obden, 1 porce denně, více porcí denně. U všech jsme měřili antropometrické ukazatele – váhu, výšku, obvod pasu a boků. Dále byl odvozen body mass index a poměr pas/boky. Po deseti minutách klidu jsme změřili u každého probanda krevní tlak na levé paži. Následně bylo provedeno sonografické vyšetření obou karotických tepen na přístroji Siemens Sonoline Versa Pro pomocí 7,5 MHz lineární sondy a v diastole změřena tloušťka intimy-medie společné karotické tepny.

Laboratorní vyšetření

Krevní odběry byly u dobrovolníků provedeny vždy ráno nalačno. Séra byla separována centrifugací a uskladněna do analýzy při teplotě - 80°C. Feritin byl stanoven pomocí enzymoimunoanalýzy (kit Kone Quartus EIA-System, Německo). Glykémie byla měřena hexokinázovou reakcí (kit Konelab, Finsko). Inzulín byl měřen v séru chemiluminiscentní enzymovou imunoanalýzou na analyzátoru Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Calif., USA). Inzulínová rezistence (HOMA-IR) byla vypočtena podle HOMA2 modelu glukózové homeostázy (Levy 1998). Enzymy alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST) byly určeny kinetickou metodou podle standardu DGKC. Celkový cholesterol a triacylglyceroly byly měřeny enzymaticky (kit Konelab, Finsko) a HDL-cholesterol stanoven přímo polyethylene glykolem modifikovaným enzymatickým měřením (kit Roche, Švýcarsko). Produkty pokročilé oxidace proteinů (AOPP) byly stanoveny spektrofotometricky (Witko-Sarsat 1996). OxLDL byly měřeny pomocí enzymoimunoanalýzy (kit Mercodia AB, Švédsko), retinol vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, CRP ultrasenzitivně imunoanalýzou (kit Brahms, Německo) za použití TRACE metody (time-resolved amplified cryptate emission, kryptor analyzer, Francie). Interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- α byly stanoveny enzymoimuno-

analýzou (kit R&D Systems, USA). Markery endotelové dysfunkce intercelulární cytoadhezivní molekula-1 (ICAM-1) a vaskulární cytoadhezivní molekula-1 (VCAM-1) byly měřeny enzymoimunoanalýzou (kit Bender MedSystem, Rakousko) a E-selektin pomocí enzymoimunoanalýzy (kit R&D Systems, USA).

Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena profesionálním statistikem. K výpočtům byl použit program BMDP Statistical Software (Los Angeles, California, USA). Pro kontinuální proměnné byla využita ANOVA (analýza rozptylu). Párové porovnání mezi tercily bylo provedeno Studentovým *t*-testem pro dva nezávislé výběry a využito Bonferroniho korekce pro mnohočetné porovnání v ANOVA. Kategorické proměnné byly porovnány χ^2 testem nebo Fisherovým testem. Dále byl použit Wilksův test normality a parametry s ne-Gausovskou distribucí byly nejprve transformovány přirozeným logaritmem. Pearsonova korelační analýza byla použita k posouzení korelací mezi sérovým feritinem a ostatními proměnnými ve vztahu k ateroskleróze a inzulínové rezistenci. Dále jsme doplnili parciální korelační analýzu vztahu feritinu k oxLDL, AOPP, HOMA-IR a E-selektinu po adjustaci na věk, obvod pasu, body mass index a parametry zánětu (parciální korelační koeficient dvou nezávislých proměnných tak byl vypočten po odstranění lineárního efektu skupiny zánětlivých markerů – CRP, IL-6, TNF- α a fibrinogenu).

Multivariační kroková lineární regresní analýza byla využita k vývoji modelu pro predikci hladiny sérového feritinu. Statistická významnost byla definována jako $p < 0,05$.

2.3.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické postižení karotických tepen

Do této studie bylo rekrutováno 72 dobrovolníků na základě novinového inzerátu, který jim nabízel preventivní zdravotní prohlídku. Všichni byli muži ve věku 40 - 60 let bez předchozí anamnézy kardiovaskulárního onemocnění. Respondenti neužívali žádné léky. Důvodem pro nábor mužů v této věkové kategorii byl předpoklad vyšších endogenních zásob železa a zároveň vyššího rizika kardiovaskulárních příhod v porovnání se stejnou věkovou kategorií žen. Klinické a měřené biochemické parametry souboru ukazuje tabulka 8. U všech byla odebrána anamnéza se zaměřením na rizikové faktory aterosklerózy a změřena výška, váha, obvod pasu a boků. Ze získaných dat pak byly vypočteny body mass index (BMI) a poměr pas/boky (WHR). Po 10ti minutách klidu změřen tlak na pravé pažní tepně. U každého dobrovolníka jsme vyšetřili ultrasonograficky karotické tepny s kontinuálním ekg záznamem na přístroji Philips iU22 lineární sondou L 12 - 5 MHz. Provedené ultrasonografické a dopplerovské vyšetření karotických tepen bylo ukládáno na pevný disk. Uložené smyčky byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru ImagePro. Měřili jsme tloušťku intima-mediae arteria carotis communis (IACC), maximální a minimální diametr arteria carotis communis během systoly a diastoly a dále byly měřeny průtokové rychlosti maximální, enddiastolická a střední. Tloušťka inti-

my-médie byla měřena v diastole na vzdálenější stěně arteria carotis communis ve vzdálenosti 10 mm od karotického bulbu.

Z naměřených hodnot byly dopočteny následující indexy:

Index rezistence $RI = (PSV - EDV) / PSV$

Pulsatilní index $PI = (PSV - EDV) / Vm$

Compliance karotické tepny (mmHg) $CAC = DD / PP$

Beta stiffness index (kPa) $\beta SI = \ln(STK / DTK) / DD$

PP (pulzní tlak) = STK - DTK; DD = $(D_{max} - D_{min}) / D_{min}$; D_{max} = maximální diametr ACC; D_{min} = minimální diametr ACC; PSV = vrcholová rychlost systolic velocity; EDV = enddiastolická rychlost; Vm = střední rychlost; STK = systolický tlak (mmHg/kPa); DTK = diastolický tlak (mmHg/kPa); 1 kPa = 7,6 mmHg

Sonograficky jsme také měřili množství intraabdominálního tuku (VFT) pomocí konvexní abdominální 5 - 1 MHz sondy ve vzdálenosti 1 cm pod pupkem. Množství viscerálního tuku bylo definováno jako vzdálenost mezi zadní stěnou přímého břišního svalu a přední stěnou aorty, měřeno v klidném end-expiriu.

Laboratorní vyšetření

Odběry krve byly provedeny vždy po nočním lačnění. Následně izolováno sérum centrifugací a zamraženo na - 80 °C do jeho analýzy. Feritin byl stanoven pomocí enzymoimunoanalýzy (kit Kone Quartus EIA-System, Německo). Glykémie byla měřena hexokinázovou reakcí (kit Konelab, Finsko). Enzymy alaninaminotransferáza a aspartátaminotransferáza byly určeny kinetickou metodou podle standardu DGKC. Celkový cholesterol a triacylglyceroly byly měřeny enzymaticky (kit Konelab, Finsko) a HDL-cholesterol stanoven přímo polyethylén glykolem modifikovaným enzymatickým měřením (kit Roche, Švýcarsko). Produkty pokročilé oxidace proteinů (AOPP) byly stanoveny spektrofotometricky (Witko-Sarsat 1996). OxLDL byly měřeny pomocí enzymoimunoanalýzy (kit Mercodia AB, Švédsko), retinol vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, CRP ultrasenzitivně imunoanalýzou (kit Brahms, Německo) za použití TRACE metody (time-resolved amplified cryptate emission, kryptor analyzer, Cezanne, Francie). Interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- α byly stanoveny enzymoimunoanalýzou (kit R&D Systems, USA). Markery endotelové dysfunkce intercelulární cytoadhezivní molekula-1 (ICAM-1) a vaskulární cytoadhezivní molekula-1 (VCAM-1) byly měřeny enzymoimunoanalýzou (kit Bender MedSystem, Rakousko) a E-selektin pomocí enzymoimunoanalýzy (kit R&D Systems, USA). Von Willebrandův faktor byl měřen pomocí LIA (Latex Immuno Assay, Stago, Francie). Apolipoprotein A1 a apolipoprotein B byly stanoveny imunoturbidimetrií. Plazmatické koncentrace Lp(a) byly měřeny imuno-elektroforézou. Oxidovaný β_2 -glykoprotein I ($\alpha\beta_2$ -GPI) byl stanoven pomocí ELISA (Cayman Chemicals Company, USA). Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) byly měřeny pomocí enzymoimunoanalýzy (kit R&D Systems, USA). Adiponectin i CD163 byly stanoveny ELISA (kit Bühlmann/ALPCO, USA a kit R&D Systems, USA).

Průtoková cytometrie

Současně jsme vyšetřovali expresi transferinových receptorů (CD71) a scavengerových receptorů typu B (CD36) na cirkulujících monocytech z periferní krve pomocí průtokové cytometrie (přístroj FACS Calibur Becton-Dickinson). Vzorky odebrané krve byly zpracovány podle standardního protokolu (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Do FACS zkumavek jsme odebrali 100 μ l krve na vzorek. Ke vzorkům jsme přidali 10 μ l příslušných protilátek.

1. negativní kontrola (bez protilátek)
2. CD14 PerCP (BD) + CD16 PE (BD) + CD36 APC (BD)
3. CD14 PerCP (BD) + CD16 PE (BD) + CD71 APC (BD)

Následovala inkubace 20 minut při pokojové teplotě. Poté byly přidány 2 ml lyzačního roztoku (BD) a pokračovala inkubace dalších 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Dalším krokem byla centrifugace 1500 rpm/5 min, promytí 4 ml PBS (2x), poté resuspendace v 0,5 ml PBS (phosphate buffered saline) a nakonec měření na cytometru FACS Calibur (BD). Hodnocení naměřených dat bylo prováděno pomocí softwaru FlowJo version 8.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Vlastní hodnocení: Monocyty byly nejprve identifikovány na základě parametrů Forward a Side scatter (monogate) → exprese CD14 a CD16 (CD14+/CD16+, CD14+/CD16- a CD14-/CD16+ buňky) → následně pak byla na monocytech hodnocena exprese CD36 (scavengerový receptor typu B) a/nebo CD71 (transferinový receptor).

Studijní soubor byl následně rozdělen na kvartily podle exprese transferinového receptoru (CD71) na membráně cirkulujících monocytů. Porovnávali jsme rozdíly mezi kvartilem s nejvyšší expresí (4. kvartil) a nejnižší expresí (1. kvartil).

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena profesionálním statistikem pomocí programu Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Univariační regresní analýza byla použita k zhodnocení vztahu mezi feritinem a poměrem TfR/F a ostatními proměnnými ve vztahu k ateroskleróze, oxidativnímu stresu a inzulínové rezistenci. Následně pak byla doplněna multivariační analýza k posouzení nezávislosti vztahu mezi feritinem, TfR/F a ostatními proměnnými, které signifikantně korelovaly v univariační regresní analýze. Párové porovnání mezi kvartily bylo provedeno Studentovým *t*-testem pro dva nezávislé výběry a využito Bonferroniho korekce pro mnohočetné porovnání v ANOVA. Kategorické proměnné byly porovnány χ^2 testem nebo Fisherovým testem. Hladina statistické významnosti byla definována jako $p < 0,05$.

Tabulka 8: **Základní charakteristiky souboru**

Parametr	n	$\bar{x} \pm sd$	Parametr	n	$\bar{x} \pm sd$
Věk (roky)	72	49.8 ± 8.67	IL-1β (pg/ml)	72	0.454 ± 0.970
Obvod pasu (cm)	72	95.61 ± 10.089	IL-6 (pg/ml)	72	1.146 ± 1.673
STK (mmHg)	72	126.0 ± 10.5	IL-8 (pg/ml)	72	2.45 ± 1.057
DTK (mmHg)	72	80.4 ± 7.4	IL-10 (pg/ml)	72	0.338 ± 0.773
BMI (kg/m ²)	72	26.8 ± 3.29	Leukocyty (x 10 ⁹ /l)	71	6.23 ± 1.531
Poměr pasu a boků	72	0.948 ± 0.058	Erytrocyty (x 10 ¹² /l)	71	4.69 ± 0.366
IACC (mm)	72	0.645 ± 0.128	Hemoglobin (g/dl)	71	14.74 ± 0.894
VFT (cm)	72	4.08 ± 1.492	Hematokrit (%)	71	42.89 ± 2.599
Kyselina močová (μmol/l)	72	381.0 ± 93.81	MCV (fl)	71	91.59 ± 3.967
ALT (μkat/l)	72	0.483 ± 0.226	TIBC (μmol/l)	71	54.21 ± 10.46
AST (μkat/l)	72	0.396 ± 0.101	CD36 (FACS)	72	91.9 ± 6.92
Fibrinogen (g/l)	72	3.32 ± 0.833	sCD163 (ng/ml)	72	540.4 ± 159.8
Celk. cholesterol (mmol/l)	72	5.23 ± 0.909	hsCRP (mg/l)	72	1.76 ± 2.02
Triacylglyceroly (mmol/l)	72	1.44 ± 0.705	Anti oxLDL (mU/ml)	72	467.9 ± 430.0
HDL cholesterol (mmol/l)	72	1.45 ± 0.350	oxLDL (U/l)	72	60.7 ± 18.57
LDL cholesterol (mmol/l)	72	3.12 ± 0.875	AOPP (μmol/l)	72	95.9 ± 44.41
Lp(a) (g/l)	72	0.155 ± 0.095	MPO (μg/l)	72	83.0 ± 37.8
Apo A1 (g/l)	72	1.58 ± 0.283	oxβ2GPI (U/ml)	72	379.4 ± 183.0
Apo B (g/l)	72	1.09 ± 0.286	vWf (%)	70	121.0 ± 35.42
Glykémie (mmol/l)	72	5.49 ± 0.486	ICAM-1 (ng/ml)	72	242.1 ± 58.0
Adiponektin (μg/ml)	72	4.12 ± 1.534	VCAM-1 (ng/ml)	72	953.4 ± 277.4
TNF-α (pg/ml)	72	1.80 ± 1.24	E-selektin (ng/ml)	72	23.62 ± 10.61
Feritin (ng/ml)	72	158.6 ± 144.03	TfR (mg/l)	72	2.51 ± 0.56

2.4. VÝSLEDKY

2.4.1. Feritin, oxidační stres a inzulinová rezistence

Průměrná hladina sérového feritinu ± SD pro celý soubor mužů byla 164 ± 123 μg/l. Tabulka 9 ukazuje porovnání ve sledovaných parametrech mezi prvním a třetím tercilem podle hladiny sérového feritinu (referenční hladina sérového feritinu u zdravých mužů je 22 - 275 μg/l). Tabulka 10 prezentuje výsledky univariačních korelací mezi sérovým feritinem a antropometrickými ukazateli, fyzickou aktivitou, příjmem masa, retinolem, aminotransferázami a plazmatickými lipidy v celém souboru. Tabulka 11 ukazuje univariační korelace mezi feritinem a markery oxidačního stresu, inzulinové rezistence a aterosklerózy. Tabulka 12 ukazuje parciální korelace mezi hladinou sérového feritinu a HOMA-IR, oxLDL, AOPP, E-selektinu po adjustaci k věku, obvodu pasu, BMI a zánětlivým ukazatelům. Tabulka 13 prezentuje výsledky krokové multivariační regresní analýzy s nezávislými determinantami predikce hladiny sérového feritinu. Nalezli jsme signifikantní korelaci mezi feritinem a parametry obezity a metabolického syndromu (obvod pasu, poměr pas/boky, BMI, hladina triacylglycerolů a HDL-cholesterolu – viz tabulka 10). V univariační analýze feritin pozitivně koreloval s parametry porušené inzulinové senzitivity (glykémie, lačný inzulin, HOMA-IR – viz tabulka 11). Doplnili jsme výpočet parciálních korelací, abychom zjistili zda není vztah feritinu a HOMA-IR signifikantně ovlivněn

věkem, BMI, obvodem pasu a parametry zánětu. Po adjustaci všech těchto proměnných zůstala korelace mezi feritinem a HOMA-IR statisticky významná (tabulka 12).

V celém souboru jsme našli rovněž pozitivní korelaci mezi feritinem a oxidativně modifikovanými LDL a pokročilými produkty oxidace proteinů (AOPP). Tyto korelace zůstaly statisticky významné i po adjustaci k věku, BMI, obvodu pasu a k parametrům zánětu. Nicméně byl patrný částečný vliv BMI a obvodu pasu (tabulka 12).

Tabulka 9: Porovnání antropometrických a biochemických parametrů mezi terciily rozdělenými podle hladiny sérového feritinu.

	První tercil (<97 ng/ml)	Druhý tercil (97–180 ng/ml)	Třetí tercil (>180 ng/ml)	Po rovnání 1. a 3. tercil p
Věk (roky)	47.97 ± 8.78	49.90 ± 7.49	47.301 ± 7.86	0.772
BMI (kg/m²)	25.59 ± 2.92	26.47 ± 2.74	27.92 ± 2.90	<0.001
WHR	0.92 ± 0.06	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.06	0.002
Obvod pasu (cm)	92.58 ± 8.73	95.98 ± 8.49	99.24 ± 8.18	<0.001
MAP (mmHg)	93.91 ± 7.43	96.29 ± 9.38	95.64 ± 8.32	0.305
oxLDL (U/l)	51.678 ± 16.625	59.132 ± 13.97	60.49 ± 14.88	0.005
AOPP (μmol/l)	92.65 ± 55.55	108.85 ± 68.83	141.99 ± 102.46	0.004
HOMA-IR	0.75 ± 0.37	1.02 ± 0.67	1.37 ± 0.84	<0.001
Inzulín (mU/l)	5.71 ± 2.91	7.71 ± 5.01	9.32 ± 4.62	<0.001
Glykémie (mmol/l)	5.18 ± 0.45	5.34 ± 0.54	5.64 ± 1.16	0.004
Triacylglyceroly (mmol/l)	1.16 ± 0.58	1.56 ± 0.98	2.03 ± 1.43	<0.001
Celk. cholesterol (mmol/l)	5.42 ± 1.14	5.78 ± 0.96	5.75 ± 1.14	0.132
HDL (mmol/l)	1.46 ± 0.32	1.43 ± 0.36	1.32 ± 0.26	0.019
LDL (mmol/l)	3.43 ± 1.10	3.65 ± 0.85	3.54 ± 0.85	0.570
ALT (μkat/l)	0.43 ± 0.17	0.49 ± 0.24	0.71 ± 0.38	<0.001
AST (μkat/l)	0.42 ± 0.11	0.44 ± 0.14	0.55 ± 0.31	0.009
IACC (mm)	0.58 ± 0.13	0.61 ± 0.12	0.59 ± 0.13	0.469
VCAM-1 (ng/m)	1,024.4 ± 509.07	973.11 ± 483.66	999.37 ± 466.03	0.879
ICAM-1 (ng/ml)	233.59 ± 74.93	235.92 ± 70.05	254.65 ± 71.50	0.081
ESEL (ng/ml)	21.82 ± 10.26	25.85 ± 10.98	31.88 ± 15.96	0.001
TNF-α (pg/ml)	0.79 ± 0.87	0.86 ± 0.76	0.87 ± 0.58	0.039
CRP (mg/l)	1.69 ± 2.07	1.94 ± 1.60	2.67 ± 2.02	0.011
IL-6 (pg/ml)	0.77 ± 0.48	1.42 ± 1.68	1.22 ± 1.00	0.006
Fibrinogen (g/l)	3.00 ± 0.65	3.06 ± 0.67	3.20 ± 0.81	0.236
Retinol (mg/l)	16.45 ± 5.74	17.51 ± 6.18	18.13 ± 5.31	0.336
Kuřáci (%)	10	10	18	0.385
Nízká fyzická aktivita (%)	28	31	51	0.035
Maso porce/osoba - týden	7.0 ± 3.0	7.3 ± 3.6	8.44 ± 3.9	0.048
Dárci krve (%)	30	10	2	<0.001

V naší studii jsme neprokázali signifikantní korelaci mezi hladinou sérového feritinu a tloušťkou intimy-mediale. Navíc jsme neprokázali ani univariační korelace mezi feritinem a markery endotelové dysfunkce (VCAM-1, ICAM-1). Pozorovali jsme statisticky významnou korelaci mezi feritinem a E-selektinem, ale po adjustaci k zánětu a obezitě nezůstala tato korelace statisticky signifikantní.

Vyšší hladina feritinu byla spojena s vyšší konzumací masa, podobně jako s retinolem a pozorovali jsme nepřímou korelaci mezi hladinou feritinu a mírou sportovní aktivity (tabulka 6).

V multivariační krokové analýze pro celý soubor byly nezávislými determinanty hladiny feritinu triacylglyceroly, obvod pasu a aminotransferázy. Tyto determinanty podmiňují 25% variabilitu v hladině sérového feritinu.

Tabulka 10: Univariační korelace mezi feritinem a antropometrickými ukazateli, fyzickou aktivitou, příjmem masa, retinolem, aminotransferázami a plazmatickými lipidy.

	Feritin		
	n	r	p
Věk	151	0.06	
BMI	151	0.34	<0.001
WHR	151	0.31	<0.001
Obvod pasu	151	0.37	<0.001
Fyzická aktivita	150	-0.20	<0.05
Příjem masa	150	0.25	<0.01
Retinol	150	0.18	<0.05
ALT	151	0.35	<0.001
AST	151	0.24	<0.01
Celkový cholesterol	151	0.18	<0.05
Triacylglyceroly	151	0.39	<0.001
HDL	148	-0.19	<0.05
LDL	150	0.11	

Tabulka 11: Univariační korelace mezi sérovým feritinem, parametry oxidačního stresu, inzulínovou rezistencí a aterosklerózou v celém souboru.

	Feritin		
	n	r	p
IACC	151	0.13	
VCAM-1	151	0.01	
ICAM-1	150	0.15	
ESEL	108	0.24	<0.05
HOMA-IR	149	0.41	<0.001
Inzulín	149	0.39	<0.001
Glykémie	151	0.24	<0.01
AOPP	151	0.32	<0.001
OxLDL	150	0.26	<0.01

Tabulka 12: Parciální korelace mezi hladinou sérového feritinu a HOMA-IR, oxLDL, AOPP, E-selektinu po adjustaci k věku, obvodu pasu, BMI a zánětlivým ukazatelům.

Korelace	Feritin – HOMA-IR (n=149)	Feritin – oxLDL (n=150)	Feritin – AOPP (n=151)	Feritin – ESEL (n=108)
	r p	r p	r p	r p
Neadjustováno	0.41 < 0.001	0.26 < 0.01	0.32 < 0.001	0.24 < 0.05
Adjustace k věku	0.41 < 0.001	0.26 < 0.01	0.32 < 0.001	0.24 < 0.05
Adjustace k obvodu pasu	0.25 < 0.01	0.18 < 0.05	0.20 < 0.05	0.173 N.S.
Adjustace k BMI	0.29 < 0.01	0.17 < 0.05	0.21 < 0.01	0.18 N.S.
Adjustace k zánětu	0.32 < 0.01	0.20 < 0.05	0.24 < 0.01	0.18 N.S.

r = parciální korelační koeficient, N.S. = nesignifikantní, zánět = CRP, IL-6, TNF- α , fibrinogen

Tabulka 13: Multivariační regresní kroková analýza s nezávislými determinanty pro predikci hladiny sérového feritinu.

Krok	Proměnná	β	SE	F
No. 1	Triacylglyceroly	0.42	0.13	24.55
No. 2	Obvod pasu	0.02	0.008	9.21
No. 3	AST	0.46	0.19	5.96

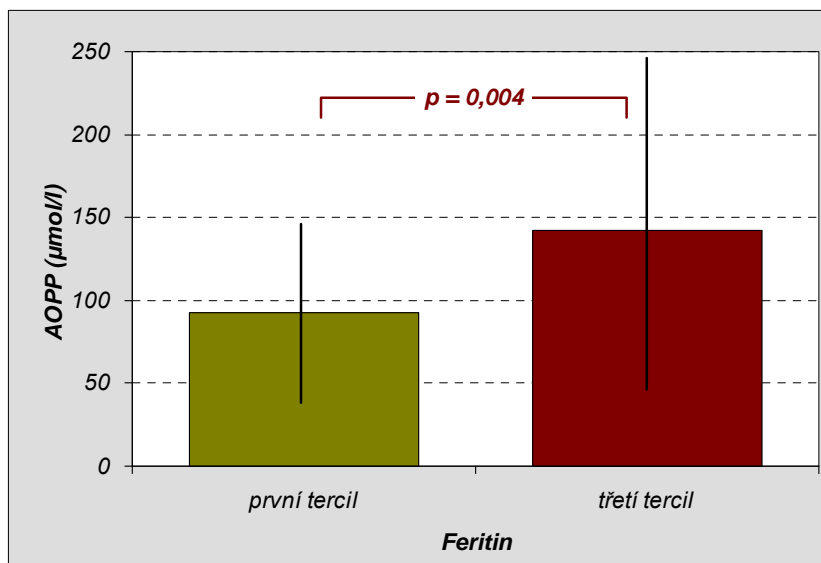
Intercept=3.02

Následující parametry byly zahrnuty do analýzy: věk, příjem masa, obvod pasu, BMI, ALT, AST, triacylglyceroly, LDL, oxLDL, AOPP, HOMA-IR, CRP, VCAM-1, ICAM-1, IACC a střední arteriální tlak.

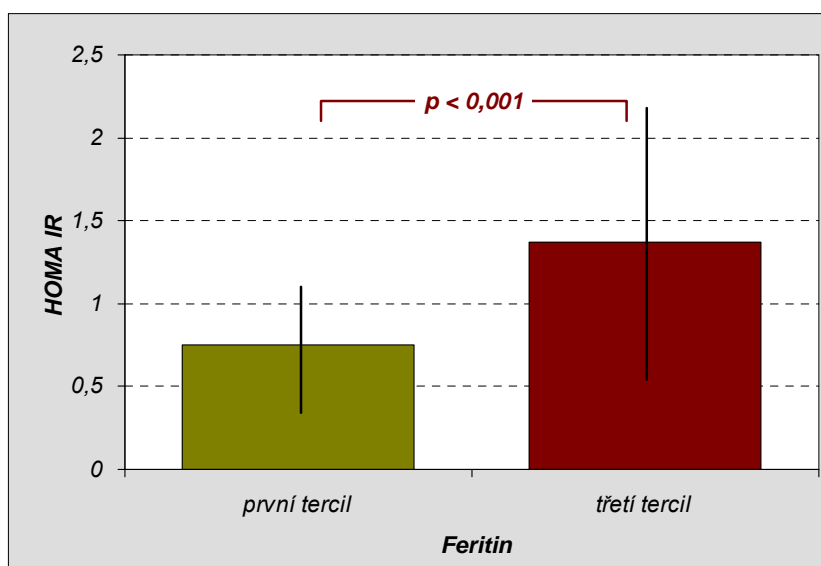
β = regresní koeficient

F hladina pro zahrnutí byla nastavena na 4.0 pro každý krok. Celkové $R^2 = 0.25$

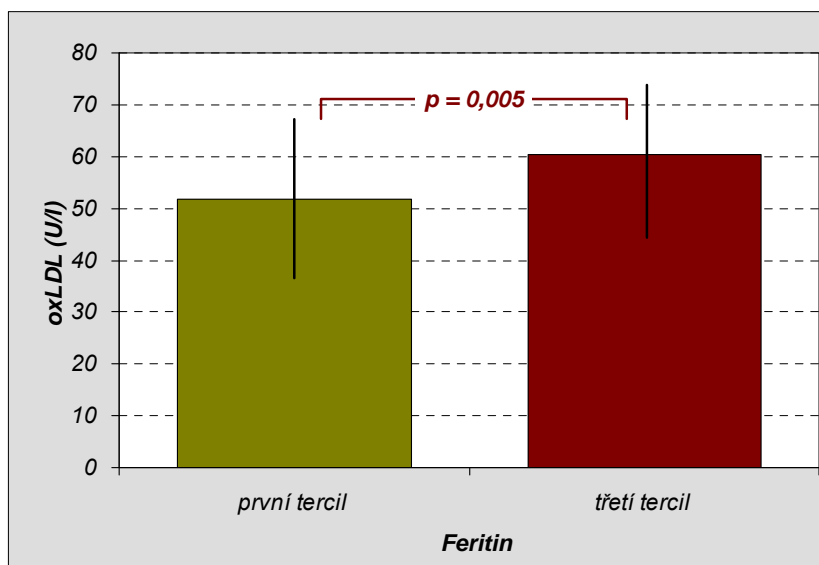
Graf 2: **Vzájemné porovnání koncentrací AOPP mezi tercily rozdělenými podle hladiny feritinu**



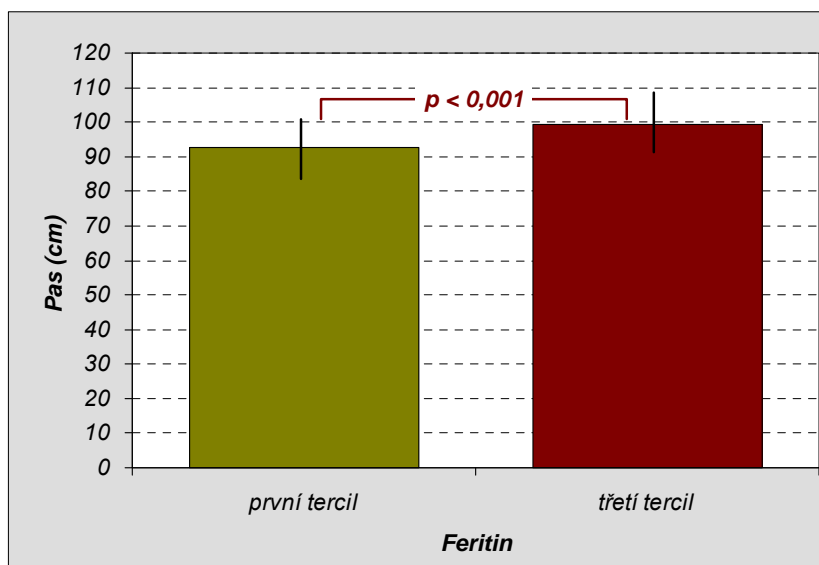
Graf 3: **Vzájemné porovnání HOMA-IR mezi tercily rozdělenými podle hladiny feritinu**



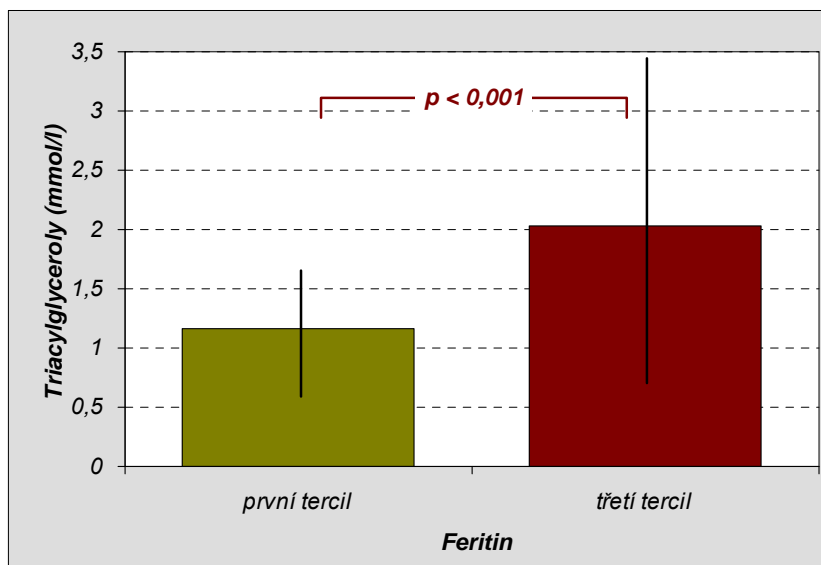
Graf 4. **Vzájemné porovnání koncentrací oxLDL mezi tercily rozdělenými podle hladiny feritinu**



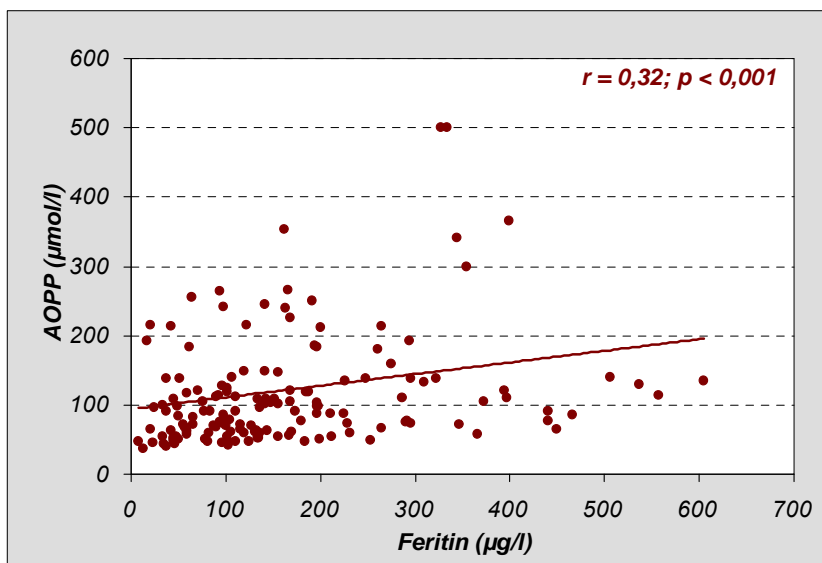
Graf 5. **Vzájemné porovnání obvodu pasu mezi tercily rozdělenými podle hladiny feritinu**



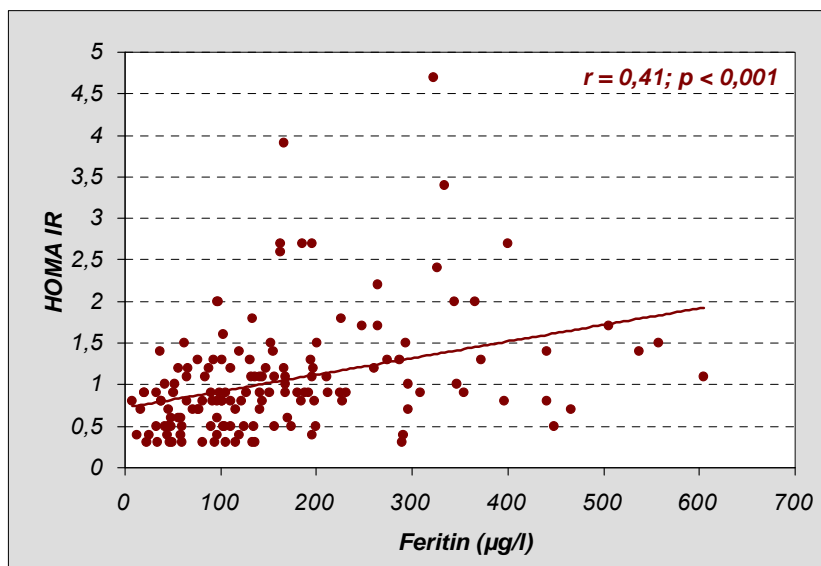
Graf 6. **Vzájemné porovnání koncentrací TG mezi tercily rozdělenými podle hladiny feritinu**



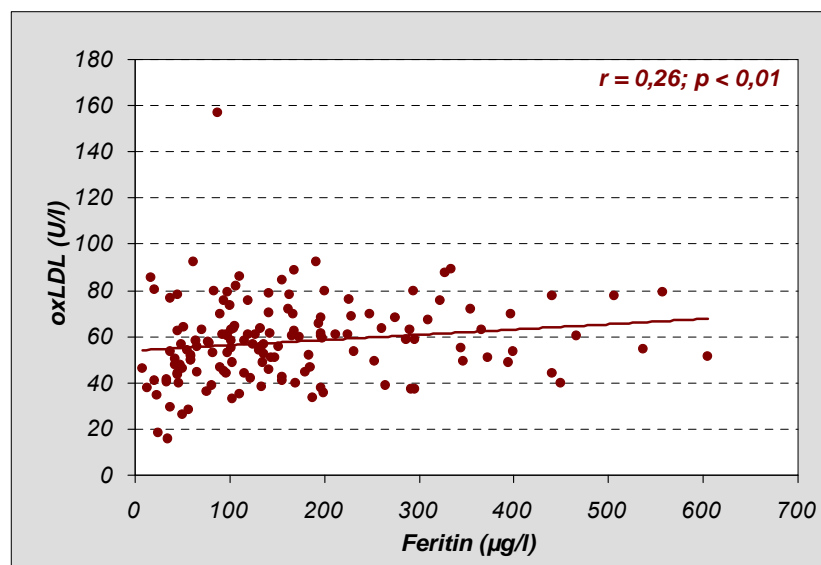
Graf 7: **Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou feritinu a koncentrací AOPP**



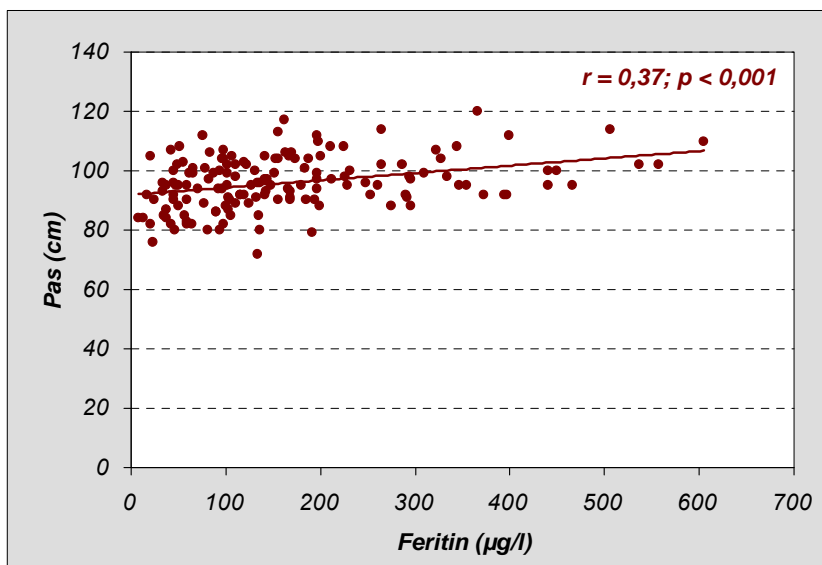
Graf 8. **Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou feritinu a HOMA-IR**



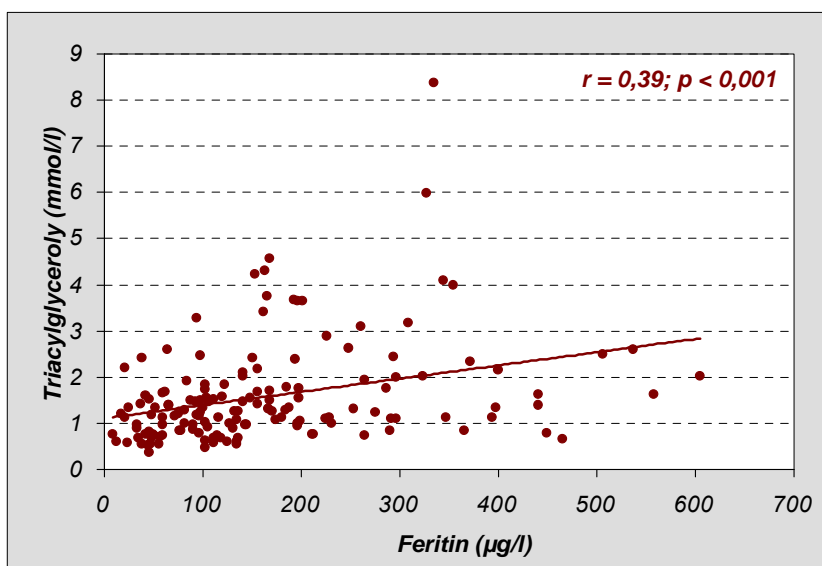
Graf 9: **Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou feritinu a koncentrací oxLDL**



Graf 10: **Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou feritinu a obvodem pasu**



Graf 11: **Pozitivní korelace mezi plazmatickou hladinou feritinu a koncentrací triacylglycerolů**



2.4.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické postižení karotických tepen

Tabulka 14 ukazuje korelace mezi sérovým ferritinem a poměrem TfR/F s antropometrickými parametry, zá-
nětlivými markery, markery oxidativního stresu, lipoproteiny a laboratorními ukazateli endotelové dysfunk-
ce v celém souboru. Sérový ferritin koreloval s abdominální obezitou – obvodem pasu ($r=0.407$, $p<0.001$),
WHR ($r=0.356$, $p=0.002$), BMI ($r=0.341$, $p=0.004$), intraabdominálním tukem ($r=0.379$, $p=0.001$), adiponekti-
nem ($r=-0.276$, $p=0.019$), triacylglyceroly ($r=0.314$, $p=0.007$), apoB ($r=0.283$, $p=0.016$), HDL-cholesterolem
($r=-0.304$, $p=0.009$), parametry oxidativního stresu – AOPP ($r=0.235$, $p=0.047$), $ox\beta_2GPI$ ($r=0.251$, $p=0.033$)
a také s hsCRP ($r=0.240$, $p=0.042$) a IACC ($r=0.295$, $p=0.012$).

Při pečlivějším testování byly všechny korelace v multivariační analýze ovlivněny vztahem ferritinu a obvodu
pasu: obvod pasu ($\beta=0.298$, $p=0.025$), adiponektin ($\beta=-0.206$, $p=0.085$), triacylglyceroly ($\beta=0.155$, $p=0.495$),
apoB ($\beta=0.032$, $p=0.851$), HDL cholesterol ($\beta=-0.084$, $p=0.532$), AOPP ($\beta=0.095$, $p=0.574$), $ox\beta_2GPI$ ($\beta=-0.112$,
 $p=0.503$), hsCRP ($\beta=0.121$, $p=0.312$), IACC ($\beta=0.144$, $p=0.240$), kyselina močová ($\beta=0.205$, $p=0.118$).

Poměr TfR/F (nikoliv ferritin) koreloval signifikantně s koncentrací hemoglobinu ($r=-0.286$, $p=0.016$ vs.
 $r=0.051$). Poměr TfR/F koreloval silněji s ostatními ukazateli metabolismu železa v porovnání s ferritinem: va-
zebná kapacita pro železo ($r=0.413$, $p=0,001$ vs. $r=-0.367$, $p=0,002$), MCV (střední objem erytrocytu)
($r=-0.359$, $p=0,002$ vs. $r=0.344$, $p=0,003$). Oba parametry – TfR/F i ferritin – korelovaly signifikantně s IACC
($r=-0.310$, $p=0,008$ vs. $r=0.295$, $p=0,012$).

Tabulka 14: **Univariální regresní analýza ferritinu a poměru TfR/F s měřenými parametry**

	Ferritin		TfR/F	
	r	p	r	p
Věk	0.040		-0.067	
Obvod pasu	0.407	***	-0.157	
STK	0.121		-0.070	
DTK	0.164		-0.150	
BMI	0.341	**	-0.066	
WHR	0.356	**	-0.226	
IACC	0.295	*	-0.310	**
VFT	0.379	**	-0.095	
K. močová	0.368	**	-0.097	
ALT	0.149		-0.106	
AST	0.151		-0.046	
Fibrinogen	0.325	**	-0.292	*
Celk.chol.	0.076		0.048	
TG	0.314	**	-0.156	
HDL chol	-0.304	**	0.100	
LDL chol	0.116		0.060	
Lp(a)	0.203		-0.112	
Apo A1	-0.139		0,036	
Apo B	0.283	*	-0,09	
Glykémie	0.047		0.036	
Adiponektin	-0.276	*	0.127	
TNF- α	0.125		0.082	

* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

	Ferritin		TfR/F	
	r	P	r	p
IL-1 β	-0.093		-0.076	
IL-6	0.145		-0.077	
IL-8	-0.145		0.233	*
IL-10	-0.034		-0.087	
Leukocyty	-0.021		-0.134	
Erytrocyty	-0.213		0.011	
Hemoglobin	0.051		-0.286	*
Hematokrit	-0.050		-0.228	
MCV	0.344	**	-0.359	**
TIBC	-0.367	**	0.413	***
CD36	0.046		0.071	
sCD163	0.005		0.239	*
hsCRP	0.240	*	0.014	
Anti oxLDL	-0.103		0.200	
oxLDL	0.203		-0.071	
AOPP	0.235	*	0.038	
MPO	-0.016		0.075	
ox β_2GPI	0.251	*	-0.100	
vWf	-0.061		0.284	*
ICAM-1	0.211		-0.183	
VCAM-1	0.038		0.033	
E-selektin	0.084		-0.127	

Multivariační analýza potvrdila, že korelace mezi poměrem TfR/F a IACC je nezávislá na ostatních tradičních rizikových faktorech aterosklerózy (Tabulka 15); navíc v porovnání s feritinem, poměr TfR/F koreloval s ostatními proměnnými, které souvisí s aterosklerotickým procesem: fibrinogenem ($r=-0.292$, $p=0,013$), vWf ($r=0.284$, $p=0,017$), sCD163 ($r=0.239$, $p=0,043$) a IL-8 ($r=0.233$, $p=0,049$). Naše výsledky tedy prokazují pozitivní korelaci mezi relativně zvýšenými endogenními zásobami železa a šířkou intimy-medie na arteria carotis communis, dále korelaci s fibrinogenem a negativní korelaci s sCD163 a IL-8. V multivariační analýze poměr TfR/F nezávisle koreloval s hemoglobinem ($\beta=-0.220$, $p=0.047$), fibrinogenem ($\beta=-0.290$, $p=0.009$), IL-8 ($\beta=0.227$, $p=0.039$) a sCD163 ($\beta=0.244$, $p=0.025$). Po přidání vWf do analýzy jsme pozorovali nezávislou korelaci pouze s fibrinogenem ($\beta=-0.301$, $p=0.007$) a IL-8 ($\beta=0.219$, $p=0.047$) (Tabulky 16A, 16B). V této souvislosti jsme také prokázali i nezávislou korelaci mezi sCD163 a vWf ($\beta=0.2400$, $p=0.0403$).

Tabulka 15: **Multivariační regresní analýza poměru TfR/F.** Asociace mezi poměrem TfR/F a IACC je nezávislá na tradičních rizikových faktorech aterosklerózy

TfR/F vs. proměnné:	β	SE β	p
Tloušťka intimy-medie	-0,3345	0,1564	0,0371
von Willebrandův faktor	0,2153	0,1263	0,0942
Glykémie	-0,1592	0,1454	0,2786
Celkový cholesterol	0,7282	0,9745	0,4583
Triacylglyceroly	-0,2603	0,3595	0,4724
HDL cholesterol	0,0349	0,4005	0,9308
LDL cholesterol	-0,2892	0,9341	0,7581
Systolický tlak	0,2351	0,2041	0,2546
Diastolický tlak	-0,1828	0,2104	0,3889
OxLDL	-0,1379	0,2194	0,5324
Množství intraabdom. tuku	-0,0723	0,1611	0,6557

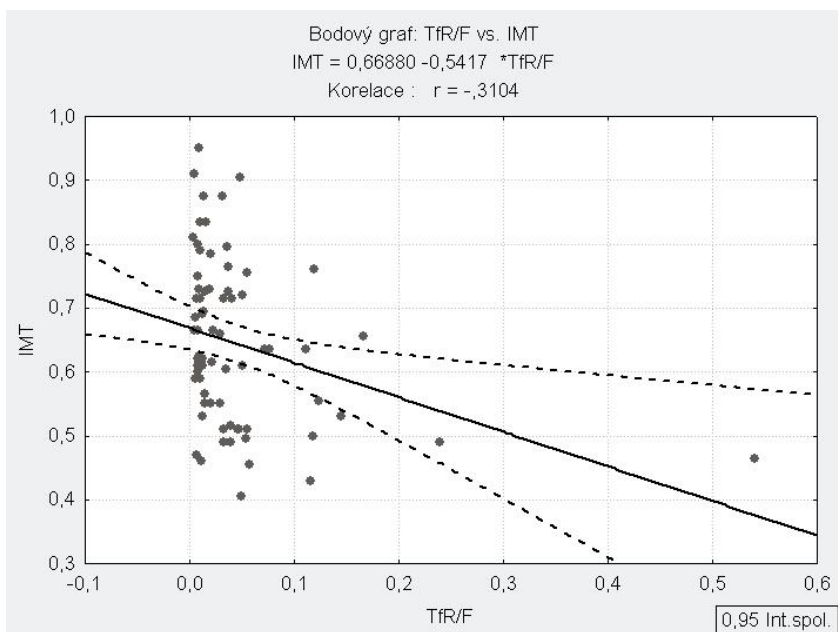
Tabulka 16A: **Multivariační regresní analýza poměru TfR/F.** Tabulka ukazuje nezávislou asociaci mezi poměrem TfR/F a hemoglobinem, fibrinogenem, IL-8 a sCD163.

TfR/F vs. proměnné:	β	SE β	p
Hemoglobin	-0.2199	0.1084	0.0465
Fibrinogen	-0.2898	0.1081	0.0093
Interleukin-8	0.2269	0.1078	0.0391
sCD163	0.2442	0.1062	0.0247

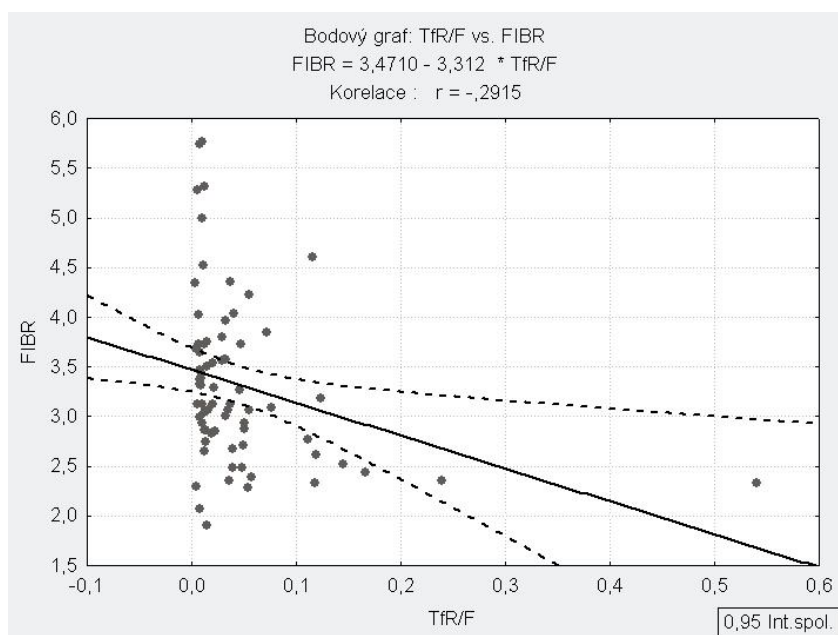
Tabulka 16B: **Multivariační regresní analýza poměru TfR/F.** Po přidání vWf do multivariační analýzy zůstala statisticky signifikantní pouze asociace mezi TfR/F a fibrinogenem a IL-8.

TfR/F vs. proměnné:	β	SE β	p
Hemoglobin	-0.1861	0.1106	0.0974
Fibrinogen	-0.3012	0.1085	0.0072
Interleukin-8	0.2194	0.1081	0.0466
sCD163	0.1744	0.1137	0.1303
von Willebrandův faktor	0.1920	0.1153	0.1009

Graf 12: Korelace mezi poměrem transferinový receptor/feritin a šířkou intimy medie na arteria carotis communis



Graf 13: Korelace mezi poměrem transferinový receptor/feritin a fibrinogenem



Muži s nejvyšší expresí transferinového receptoru na monocytech (hodnoceno průtokovou cytometrií) vykazovali signifikantně vyšší poddajnost arteria carotis communis ($p < 0,05$), nižší hodnoty indexu tuhosti ($p < 0,01$) a vyšší hladinu plazmatického E-selektinu v porovnání s muži s nízkou expresí transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů. Rovněž jsme v celém souboru mužů pozorovali pozitivní korelaci mezi expresí CD71 na povrchu cirkulujících monocytů a poddajností arteria carotis communis ($r = 0,245$; $p < 0,05$). Srovnávané skupiny se signifikantně nelišily věkem, parametry obezity, lipidovými parametry ani ukazateli zásobního železa. Pozorovali jsme u nich signifikantně rozdílnou hladinu ALT, kyseliny močové a ceruloplazminu.

Tabulka 17: Porovnání kvartilů podle exprese CD71 na monocytech – antropometrické parametry a železo

Proměnná	Kvartil 4 Vysoká exprese CD71		Kvartil 1 Nízká exprese CD71		p
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
CD71	18	0,628±0,304	18	0,094±0,031	0,0000
věk (roky)	18	46,5±7,93	18	50,8±7,99	0,1204
BMI (kg/m ²)	18	26,4±3,04	18	26,5±2,57	0,9266
WHR	18	0,94±0,057	18	0,95±0,055	0,5748
Intraabd. tuk (cm)	18	4,24±1,40	18	4,29±1,72	0,9284
STK (mmHg)	18	126,1±11,29	18	124,4±10,97	0,6691
sTfR (mg/l)	18	2,57±0,48	18	2,38±0,61	0,3175
Fe (μmol/l)	18	18,4±4,83	18	17,8±5,45	0,7337
Feritin (ng/ml)	18	130,2±115,25	18	200,9±183,16	0,1746
Transferin (g/l)	18	2,69±0,332	18	2,44±0,327	0,0299
sTfR/feritin	18	0,047±0,055	18	0,057±0,127	0,7521
VK-Fe (μmol/l)	17	55,1±16,51	18	51,2±8,12	0,3783

Tabulka 18: Porovnání kvartilů podle exprese CD71 na monocytech – ateroskleróza

Proměnná	Kvartil 4 Vysoká exprese CD71		Kvartil 1 Nízká exprese CD71		p
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
IACC (mm)	18	0,61±0,129	18	0,66±0,123	0,1911
CAC (mmHg)	18	0,002±0,001	18	0,001±0,001	0,0246
SI (mmHg)	18	6,01±1,647	18	7,80±2,109	0,0097
PI	18	1,87±0,325	18	1,74±0,265	0,1934
RI	18	0,743±0,059	18	0,731±0,043	0,4807
E-selectin (ng/ml)	18	18,8±5,59	18	24,2±6,40	0,0106
VCAM-1 (ng/ml)	18	879,5±248,16	18	981,9±332,51	0,3021
ICAM-1 (ng/ml)	18	233,0±43,96	18	232,6±54,81	0,9835
vWF (%)	18	120,3±32,01	18	114,4±37,56	0,6126

Tabulka 19: Porovnání kvartilů podle exprese CD71 na monocytech – interleukiny

Proměnná	Kvartil 4 Vysoká exprese CD71		Kvartil 1 Nízká exprese CD71		p
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
TNF-α (pg/ml)	18	1,843±0,859	18	1,774±1,599	0,8721
IL-1β (pg/ml)	18	0,378±0,388	18	0,750±1,847	0,4089
IL-6 (pg/ml)	18	0,662±0,446	18	0,799±0,374	0,3244
IL-8 (pg/ml)	18	2,308±1,025	18	2,392±1,007	0,8042
IL-10 (pg/ml)	18	0,188±0,302	18	0,313±0,763	0,5217

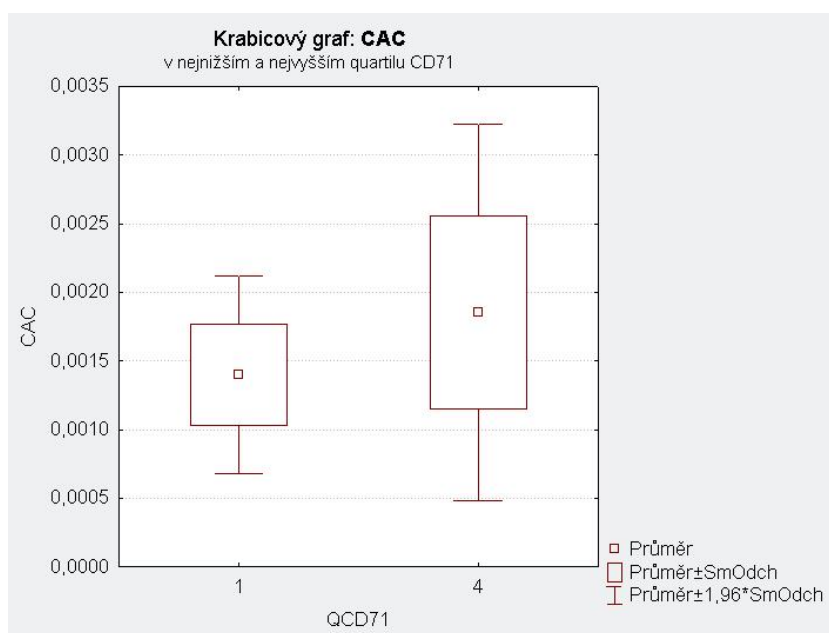
Tabulka 20: Porovnání kvartilů podle exprese CD71 na monocytech

Proměnná	Kvartil 4 Vysoká exprese CD71		Kvartil 1 Nízká exprese CD71		p
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
Thioredoxin ($\mu\text{g/l}$)	18	77,8 \pm 75,95	18	51,8 \pm 34,04	0,1948
oxLDL (U/l)	18	66,6 \pm 20,18	18	61,9 \pm 20,29	0,4876
AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	18	113,9 \pm 57,39	18	91,3 \pm 40,90	0,1824
Retinol (mg/l)	18	1,07 \pm 0,418	18	1,01 \pm 0,290	0,6169
Tokoferol (mg/l)	18	10,7 \pm 5,28	18	9,9 \pm 4,04	0,6225

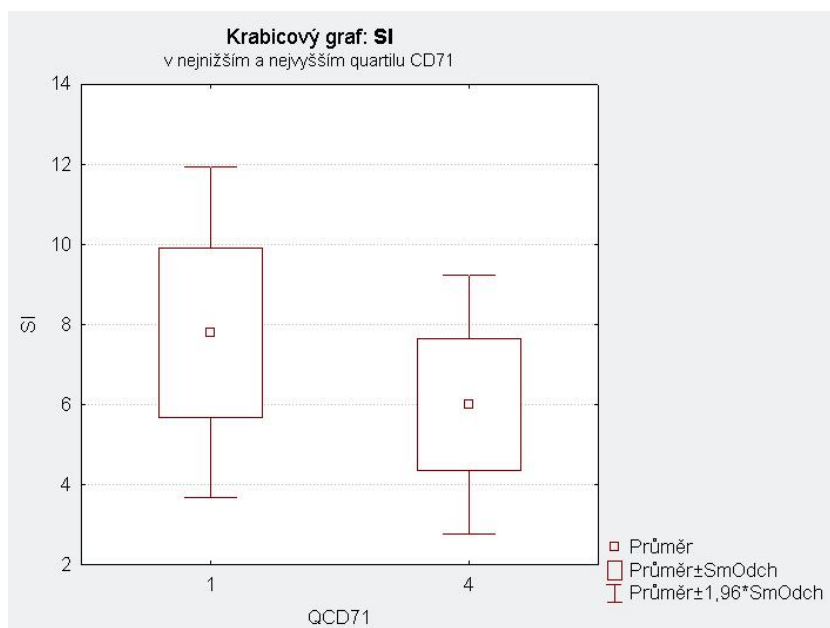
Tabulka 21: Porovnání kvartilů podle exprese CD71 na monocytech – KO, JT, lipidogram, glykémie

Proměnná	Kvartil 4 Vysoká exprese CD71		Kvartil 1 Nízká exprese CD71		p
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
Leukocyty ($\times 10^9/l$)	17	6,14 \pm 1,07	18	5,71 \pm 0,85	0,1895
Erytrocyty ($\times 10^{12}/l$)	17	4,74 \pm 0,30	18	4,70 \pm 0,31	0,754
Hemoglobin (g/dl)	17	14,85 \pm 0,66	18	14,71 \pm 0,87	0,5936
Hematokrit (%)	17	43,0 \pm 1,95	18	42,8 \pm 2,48	0,8159
Urea (mmol/l)	18	5,52 \pm 1,26	18	5,37 \pm 1,16	0,7225
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	18	93,9 \pm 8,05	18	92,7 \pm 9,02	0,6706
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	18	12,5 \pm 5,75	18	12,1 \pm 5,00	0,8061
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	18	0,56 \pm 0,228	18	0,41 \pm 0,182	0,0355
AST ($\mu\text{kat/l}$)	18	0,41 \pm 0,077	18	0,38 \pm 0,084	0,2384
GMT ($\mu\text{kat/l}$)	18	0,65 \pm 0,477	18	0,50 \pm 0,302	0,2494
Kyselina močová ($\mu\text{mol/l}$)	18	397,6 \pm 66,76	18	329,8 \pm 52,27	0,0019
Ceruloplazmin (g/l)	18	0,22 \pm 0,026	18	0,20 \pm 0,031	0,0466
hsCRP ($\mu\text{g/ml}$)	18	1,35 \pm 1,425	18	1,77 \pm 1,752	0,4544
Celk. cholesterol (mmol/l)	18	5,60 \pm 1,105	18	5,30 \pm 0,673	0,3427
HDL cholesterol (mmol/l)	18	1,47 \pm 0,509	18	1,59 \pm 0,404	0,4343
LDL cholesterol (mmol/l)	18	3,28 \pm 1,112	18	3,15 \pm 0,748	0,6743
Triacylglyceroly (mmol/l)	18	1,75 \pm 0,887	18	1,25 \pm 0,555	0,0501
Glykémie (mmol/l)	18	5,64 \pm 0,314	18	5,52 \pm 0,602	0,4582

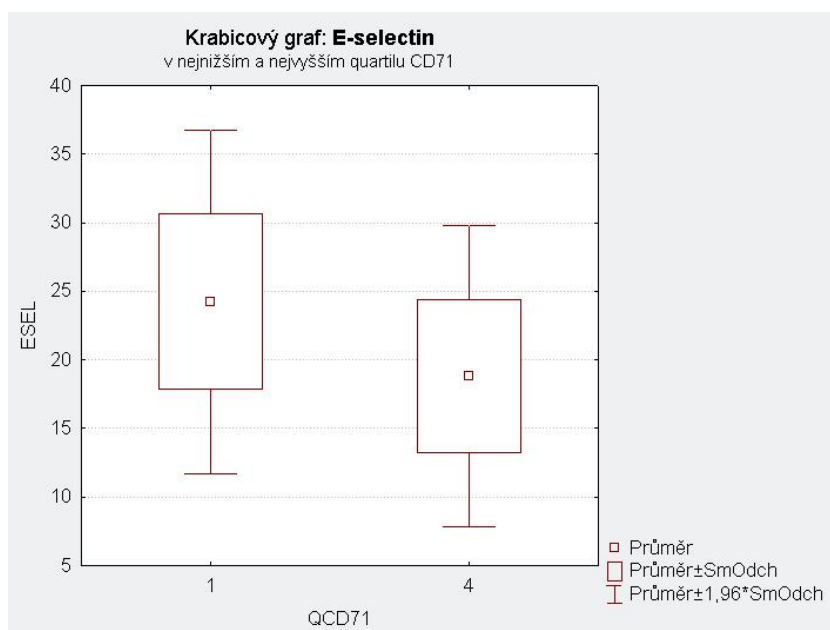
Graf 14: CAC v nejnižším a nejvyšším kvartilu CD71 (v mmHg)



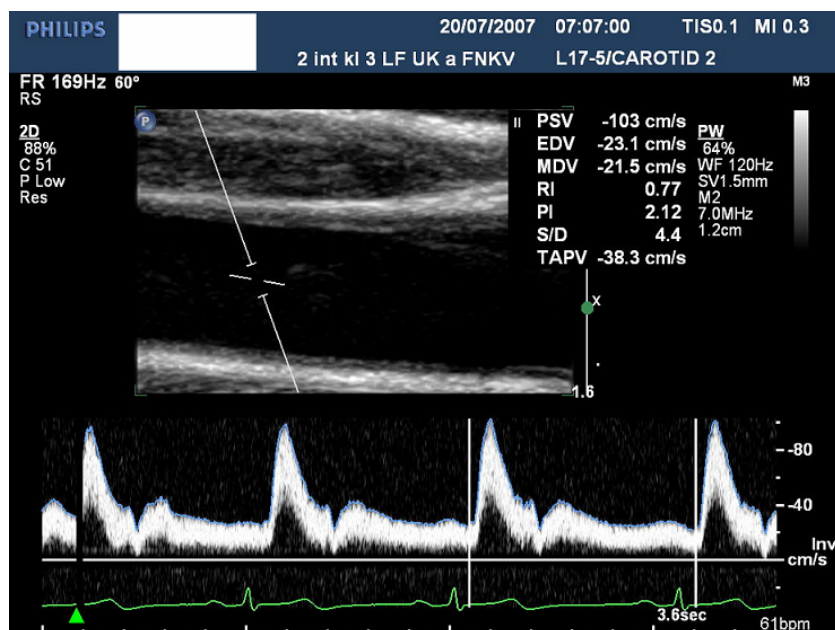
Graf 15: SI v nejnižším a nejvyšším kvartilu CD71 (v mmHg)



Graf 16: E-selektin v nejnižším a nejvyšším kvartilu CD71 (v ng/ml)



Obrázek 3: Měření rychlostí a indexů pomocí pulzního dopplera v arteria carotis communis



2.5. DISKUZE

2.5.1. Feritin, oxidační stres a inzulínová rezistence

V našem souboru jsme prokázali korelaci mezi feritinem, AOPP, oxLDL a inzulínovou rezistencí. Tento náález podporuje hypotézu prooxidativního efektu železa *in vivo* a představuje jeden z možných mechanismů porušené inzulínové senzitivity (Tuomainen 1997, Fernández-Real 1998, Ford 1999). Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) mohou fungovat jako signální molekuly, které aktivují řadu buněčných pochodů. *In vitro*, ROS aktivují serin-kinázy (Kyriakis 1996). Signální buněčné dráhy nabízejí mnoho substrátů pro takto aktivované kinázy, zahrnují inzulínový receptor a rodinu substrátových proteinů inzulínového receptoru. Zvýšená fosforylace serinu snižuje fosforylaci tyrozinu, a tak ovlivňuje účinek inzulínu na samotný inzulínový receptor (Paz 1997, Evans 2003).

Pozorovali jsme pozitivní korelaci mezi plazmatickým feritinem, parametry abdominální obezity a elevovanými aminotransferázami. Triacylglyceroly, obvod pasu a aminotransferázy byly současně determinantami sérového feritinu v multivariační krokové analýze. Akumulace tuku v játrech bývá spojována s metabolickým syndromem a řada studií také prokázala asociaci mezi jaterní steatózou a parametry metabolického syndromu (Mendler 1999). Je známo, že steatotická játra jsou náchylnější k poškození reaktivními kyslíkovými radikály. Železo uvolněné z feritinu katalyzuje tvorbu volných kyslíkových radikálů a může tak prostřed-

nictvím oxidativního stresu přispívat k hepatocelulárním poškození (*Trombini 2007*). Nosologická jednotka spojující abnormality metabolismu železa, porušenou inzulínovou senzitivitu a steatohepatitidu je v anglosaské literatuře nazývána „insulin-resistance-associated-hepatic-iron-overload“ (přetížení jater železem spojené s inzulínovou rezistencí) (*Chitturi 2001*). Vysoké zásoby železa v játrech mohou navodit inzulínovou rezistenci omezením jaterní kapacity pro extrakci inzulínu. To má za následek poruchu v supresi produkce glukózy játry a periferní hyperinzulinémii (*Niederau 1984, Ferrannini 2000*). Deplece železa naopak zlepšuje intracelulární signalizaci v hepatocytu po navázání inzulínu, zvyšuje transkripci a expresi inzulínových receptorů v hepatocytu i expresi genů zahrnutých do příjmu glukózy (*Fargion 2005*). V kosterním svalu je popsán mechanismus inhibice translokace glukózových transportérů GLUT 1 a 4 při nadbytku železa a zvýšení jejich aktivity po depleci železa (*Potashnik 1995*). Zvýšené zásoby železa ve svalu mohou usnadňovat oxidaci volných mastných kyselin a tak interferovat s metabolismem glukózy. Podobně může železo ovlivňovat účinek inzulínu v adipocytech ovlivněním transportu glukózy nezávisle na mastných kyselinách (*Green 2006*). Pravidelné odběry krve navíc zlepšují inzulínovou senzitivitu (*Facchinini 1998, Fernández-Real 2005*).

S ohledem na omezené vylučování železa je pro jeho celkové množství v organismu klíčový příjem z potravy. Stejně jako nízký příjem železa způsobuje sideropenickou anémii, tak nadbytečný příjem železa může organismus poškozovat oxidačním stresem. V naší studii konzumace masa pozitivně korelovala se zvýšenou hladinou feritinu. Hemové železo přítomné v mase reprezentuje 2/3 celkového množství resorbovaného železa z potravy, zatímco nehemové železo obsažené v rostlinách představuje pouze 1/3 a jeho resorbce je ovlivněna různými složkami potravy (*Conrad 2001*). V tomto světle může být fortifikace potravin železem, prováděná v některých zemích, potenciálně nebezpečná a to zejména pro jedince s normálními nebo zvýšenými endogenními zásobami železa. Jsou známy i prospektivní studie sledující vztah mezi dietním příjmem železa a rizikem DM 2. typu (*Jiang 2004, Lee 2004, Rajpathak 2006*). Ve všech byl příjem hemového železa v potravě spojen se zvýšeným rizikem vzniku diabetes mellitus 2. typu. Nelze však vyloučit i další faktory podílející se na asociaci mezi feritinem, zvýšeným příjmem masa a rizikem rozvoje DM 2. typu. Například fakt, že zvýšený příjem hemového železa, které je součástí červeného masa, může být odrazem zvýšeného celkového denního kalorického příjmu včetně množství tuků v potravě a s nimi spojenou větší prevalencí obezity (*Wang 2009*). Námi pozorovaná pozitivní korelace mezi feritinem a retinolem může být vysvětlena právě větší konzumací masa a tuků a lepší absorpcí retinolu z gastrointestinálního traktu (*Harrison 2005*).

V naší studii jsme také pozorovali negativní korelaci mezi plazmatickou hladinou feritinu a pravidelnou fyzickou aktivitou. Z předchozích studií se sportovci je známo, že cvičení zvyšuje ztráty železa gastrointestinálním traktem, zvyšuje krvetvorbu a tím i spotřebu železa a v neposlední řadě může vést k hemoglobinurii, která je následkem ruptury membrán erytrocytů v chodidlech při běhání (*Beard 2000*). Samozřejmě jak zvýšený příjem masa, tak i nedostatek fyzické aktivity přispívají k samotnému metabolickému syndromu (*Lutsey 2008, Slentz 2005*).

Jako autoři jsme si vědomi limitací studie tj. průřezová s menším souborem pacientů. Její zaměření na zdravé muže a relativní náhodnost jejich výběru na základě inzerátu ve volně dostupných novinách v metru s jasně definovanými vstupními kritérii předpokládají, že studijní soubor může dobře reprezentovat zdravou mužskou populaci v Praze. V souhrnu výsledky naší studie podporují asociaci mezi hladinou plazmatického feritinu a oxidativní modifikací lipidů a proteinů *in vivo*. Zvýšené endogenní zásoby železa mohou přispívat k poruše inzulínové senzitivity prostřednictvím oxidačního stresu v kohortě zdravých mužů.

2.5.2. Endogenní zásoby železa a aterosklerotické postižení karotických tepen

Pro hodnocení endogenních zásob železa se zdá být vhodnější poměr TfR/F. Jak také naznačují výsledky naší studie poměr TfR/F, spíše než feritin, odpovídal tradičním indikátorům chronické deplece železa jako jsou koncentrace hemoglobinu a objem erytrocytu a na rozdíl od feritinu nekoreloval s parametry abdominální obezity a s hsCRP. Jak poměr TfR/F tak feritin korelovaly s indikátorem progresu aterosklerózy – tloušťkou intimy-medie arteria carotis communis. Tento náleze je v souladu s předchozími studiemi, ve kterých hladina sérového feritinu korelovala s aterosklerózou karotid, progresí preexistujících aterosklerotických lézí a rizikem infarktu myokardu (*Wolff 2004, Salonen 1992, Kiechl 1997, Tuomainen 1997*). Jiní autoři však souvislost mezi feritinem a aterosklerózou naopak neprokázali (*Ascherio 1994, Stampfer 1993, Moore 1995*). Na těchto inkonzistentních výsledcích se může právě podílet fakt, že feritin, jako protein akutní fáze, bývá zvýšen při zánětu a obezitě. I v naší studii byla asociace mezi hladinou plazmatického feritinu a IACC v multivariační regresní analýze ovlivněna parametry abdominální obezity na rozdíl od vztahu mezi TfR/F a IACC, který byl nezávislý na tradičních rizikových faktorech aterosklerózy včetně množství intraabdominálního tuku. Vztah mezi hladinou plazmatického feritinu a aterosklerózou karotid může také částečně odrážet zánět a lehké jaterní onemocnění a to zejména u osob s metabolickým syndromem a diabetes mellitus 2. typu (*Mascitelli 2008*).

V souladu s předchozími studiemi jsme tedy dokumentovali, že koncentrace feritinu je spojena s markery abdominální obezity (WHR, intraabdominálním tukem) a s dyslipidemií asociovanou s metabolickým syndromem (vyšší triacylglyceroly, nízký HDL-cholesterol) (*Mainous 2004*). Kromě těchto nálezů jsme v naší studii pozorovali i pozitivní korelaci feritinu s hsCRP a oxβ2GPI (kombinovaným markerem zánětu a oxidačního stresu).

Relevantní roli železa v ateroskleróze potvrzuje také náleze zvýšené exprese transferinového receptoru přímo v karotických aterosklerotických plátech. Exprese TfR korelovala pozitivně s akumulací feritinu a s infiltrací makrofágy, které způsobují další progresi velikosti plátu a zároveň vedou k jeho destabilizaci (*Li 2008*). V klinické studii bylo také prokázáno, že kontrolovaná redukce zásobního železa u definované skupiny mladších

pacientů s aterosklerózou periferních tepen může vést ke statisticky významnému snížení celkové mortality a snížení kombinovaného rizika smrti, nefatálního infarktu myokardu a mozkové příhody (*Zacharski 2007*).

V multivariační analýze poměr TfR/F koreloval nezávisle negativně s fibrinogenem a pozitivně s sCD163 a IL-8. Bylo prokázáno, že fibrinogen, kromě účasti v plazmatické koagulaci, sehrává důležitou roli i v iniciální a pokročilé fázi aterosklerózy, protože ovlivňuje formaci aterosklerotického plátu. Aterosklerotické pláty u pacientů se zvýšenou plazmatickou hladinou fibrinogenu vykazují vyšší zánětlivou aktivitu a vulnerabilitu (tj. vysoký podíl zánětlivých buněk a tenkou fibrózní čapku) (*Mauriello 2000, Sabeti 2005, Devendra 2010*). Plazmatická hladina fibrinogenu odráží zánětlivý proces v arteriální stěně (*Libby 2005*). Miura et al. prokázali nezávislou korelaci mezi plazmatickou hladinou fibrinogenu a dietním příjmem železa. Na základě tohoto nálezu autoři vyslovili hypotézu, že železem navozený oxidační stres a oxidativní modifikace LDL představují důležitý krok v rozvoji aterosklerózy jako chronického zánětlivého onemocnění a že fibrinogen jako zánětlivý marker reflektuje vzniklý aterosklerotický proces (*Miura 2006*).

V naší studii, poměr TfR/F pozitivně koreloval s sCD163. Tento nález byl poněkud překvapivý, protože jsme očekávali, že zvýšené endogenní zásoby železa budou naopak pozitivně korelovat se solubilním makrofágovým hemoglobin scavengerovým receptorem CD163. Vzájemný vztah mezi receptorem CD163 a poměrem TfR/F však může být poněkud komplikovanější. Davis a Zarev popsali silnou inverzní korelaci mezi expresí membránové vázaného mCD163 a hladinami solubilního sCD163, nezávisle na počtu cirkulujících monocytů (*Davis a Zarev 2006*). Lze tedy očekávat, že membránově vázané receptory mCD163 mohou být spíše zvýšené u mužů se zvýšenými endogenními zásobami železa. Bohužel jsme však neměřili přímou expresi mCD163 na povrchu monocytů. Předpokládá se, že efektivní clearance extracelulárního hemoglobinu receptorem mCD163 chrání před oxidační toxicitou hemu (*Schaer 2006*). Kromě toho, že CD163 funguje jako scavengerový receptor, má navíc protizánětlivé a antiaterogenní vlastnosti (ovlivňuje syntézu interleukinu-10, hemoxygenázy a bilirubinu) (*Abraham 2006, Moestrup 2004*). Experimentální studie dokumentovaly, že plazmatický sCD163 je výsledkem uvolnění membránově vázaného mCD163 z aktivovaných makrofágů a že dynamické změny v hladinách sCD163 a mCD163, spíše než aktuální hladiny, mohou být dostupným diagnostickým markerem reflektujícím průběh zánětlivého procesu. Nicméně, v naší studii jsme nepozorovali korelaci mezi sCD163 a plazmatickou hladinou CRP. Je také známo, že plazmatický sCD163, nikoliv membránově vázaná forma, funguje jako cytokin snižující aktivaci a proliferaci T lymfocytů (*Frings 2002*). V jiné studii plazmatické hladiny sCD163 korelovaly s rozsahem koronární aterosklerózy a to nezávisle na tradičních rizikových faktorech ischemické choroby srdeční (*Aristoteli 2006*).

Poměr TfR/F v naší studii koreloval negativně s IL-8. IL-8 je důležitým mediátorem imunitní odpovědi. V současné době je jen velmi málo dat z větších klinických studií, které by hodnotily přídatný vliv IL-8 s ohledem na tradiční rizikové faktory a to jako markeru krátkodobé i dlouhodobé prognózy ve vztahu k akutní kardiovaskulární příhodě nebo i jeho úlohu v primární prevenci aterosklerózy (*Apostolakis 2009*). V největší studii

případů a kontrol posuzující prediktivní hodnotu IL-8 u pacientů s ICHS, prokázali Herder et al., že vstupní koncentrace IL-8 byla signifikantně vyšší u pacientů s ICHS v porovnání s kontrolním souborem. Po adjustaci na další kardiovaskulární a imunologické rizikové faktory autoři prokázali, že systémové hladiny IL-8 predikují ICHS, ale nepředstavují nezávislý rizikový faktor ICHS (Herder 2006).

Izolované monocyty exprimují na svém povrchu transferinové receptory a jsou schopny přijímat železo vázané na transferin. Při přeměně monocyty na makrofág se významně zvyšuje počet transferinových receptorů na povrchu buňky (Bjorn-Rasmussen 1985). Je však známa i studie *in vitro*, která neprokázala signifikantní zvýšení transferinových receptorů (CD71) při přeměně monocyty na makrofága (Andreesen 1990). Ve vztahu k našemu pozorování, měli muži s nejnižší expresí transferinových receptorů na cirkulujících monocyttech horší poddajnost a vyšší tuhost karotických tepen v porovnání s muži s vysokou expresí transferinových receptorů na cirkulujících monocyttech. Tento nálezn by mohl být teoreticky odrazem vyššího intracelulárního obsahu železa v makrofágu a v důsledku toho akcelerovaného aterosklerotického procesu. V naší studii by pro to mohla svědčit nepřímo i nižší plazmatická hladina transferinu u mužů s nízkou expresí transferinových receptorů na monocyttech. Závěry studií *in vitro* jsou ve vztahu exprese transferinových receptorů na povrchu makrofágu a množství intracelulárního železa rozporuplné. Některé studie prokázaly, že na rozdíl od ostatních buněk v organizmu zvýšená nabídka železa i zvýšený intracelulární obsah železa v makrofágu paradoxně zvyšuje transkripci i translaci transferinového receptoru *in vitro* (Testa 1989). Podle autorů se tak děje v důsledku překvapivé aktivace IRP-1 (Testa 1991, Ponka 1999). Jiná studie však prokázala pouze vyšší transkripci mRNA pro TfR-1, ale nikoliv celkových hladin proteinu TfR-1 po nasycení makrofágů železem (Pawelczyk 2006). Nabízejí se i další regulační mechanismy vedoucí ke změně exprese transferinových receptorů na povrchu monocyty zejména cytokiny. Je známo, že IFN- γ snižuje transkripci mRNA pro TfR a tak i expresi TfR na membráně monocyty. Na druhé straně, studie *in vivo* demonstrovaly, že dieta s vysokým obsahem železa redukuje IFN- γ (Omara 1994). Protizánětlivě působící cytokiny IL-4, IL-10 a IL-13, produkované Th-2 buňkami působí proti účinkům IFN- γ na homeostázu železa v makrofágu. Jejich podání tlumí tvorbu NO a následnou aktivaci IRP. Zvyšují translaci feritinu i transkripci a syntézu TfR. Protizánětlivě působící cytokiny produkované Th-2 buňkami zvyšují tedy TfR řízený přísun železa do makrofágu. Podílí se spolu s prozánětlivými cytokiny (TNF- α , IL-1 a IL-6) na poklesu hladiny železa v plazmě a vzniku hyperferitinemie, hlavním patogenetickým mechanismu vedoucím k anémii chronických onemocnění (Weiss 2002). Transkripční kontrolní mechanismy zvyšují expresi a hladiny feritinu během akutní zánětlivé odpovědi (Torti et al. 2002). Prozánětlivě působící cytokiny TNF- α , IL-1 a IL-6 zvyšují syntézu feritinu, *in vitro* snižují TfR řízený přísun železa do buněk RES, ale jejich podání *in vivo* vede k poklesu hladiny železa v plazmě. Paradoxně vystavení makrofágů působení TNF- α bylo spojeno s přechodným vzestupem intracelulárního labilního poolu železa, který se účastní v aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (Xiong 2003). Transientní změny intracelulárního volného železa hrají důležitou roli v dalších stres-signálních odpovědích (Deb 2009). Proto se předpokládá, že tyto cytokiny stimulují přísun železa do makrofágu nezávisle na transferinu (např. cestou hemoglo-

binu, ferritinu, lactoferinu, erytrofagocytózou nebo transmembránovými přenašeči pro železo). Současně mohou inhibovat export z buněk prostřednictvím feroportinu. Kombinace buňkou řízeného snížení feroportinu a zvýšení ferritinu má za následek retenci železa a jeho sekvestraci. I s ohledem na signifikantní rozdíl v hladinách E-selektinu se domníváme, že snížená exprese transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů by mohla být odrazem subklinického zánětu při ateroskleróze a s ním spojených změn v poddajnosti karotických tepen. Bohužel jsme v naší studii neměřili přímo intracelulární obsah železa v monocytech. Nepozorovali jsme statisticky signifikantní korelaci mezi exprimovanými transferinovými receptory na povrchu monocytu a cirkulujícími transferinovými receptory či hladinou sérového ferritinu ani korelaci mezi CD71 a stanovovanými interleukiny. Při porovnání 1. a 4. kvartilu podle CD71 vykazovali jedinci s nejvyšší expresí CD71 signifikantně vyšší hladinu plazmatického transferinu.

Probandi v naší studii byli zdraví muži v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění bez předchozí anamnézy farmakologické či intervenční léčby. Lze proto očekávat, že by pacienti s klinickou manifestací aterosklerózy (ICHS, ICHDK nebo ischemická CMP) mohli vykazovat i odlišné výsledky. Autoři jsou si vědomi limitací studie: relativně malým studijním souborem a také tím, že je naše studie průřezová. Nicméně její zaměření na zdravé jedince a jejich relativně nezávislý nábor přes inzerát ve volně dostupných novinách předpokládá, že studijní soubor může dobře reprezentovat zdravou pražskou mužskou populaci.

2.6. ZÁVĚR

V naší studii jsme prokázali pozitivní korelaci plazmatického ferritinu s abdominální obezitou a s parametry metabolického syndromu. Prokázali jsme asociaci mezi hladinou plazmatického ferritinu a oxidativní modifikací lipidů a proteinů *in vivo*. Železo uvolněné z ferritinu katalyzuje tvorbu volných kyslíkových radikálů a může tak prostřednictvím oxidačního stresu přispívat k hepatocelulárním poškozením. V souladu s tímto patofyziologickým mechanismem je i nález pozitivní asociace mezi hladinou plazmatického ferritinu a elevací aminotransferáz. V kohortě zdravých mužů pozitivně korelovala hladina plazmatického ferritinu s inzulínovou rezistencí a tato pozitivní korelace zůstala statisticky významná i po adjustaci k věku, BMI, obvodu pasu a k parametrům zánětu. Rozvoj inzulínové rezistence s následnou hyperglykemií samozřejmě významně přispívá k akceleraci aterosklerotického procesu.

Na základě našich předchozích výsledků, které prokázaly částečné ovlivnění plazmatické hladiny ferritinu závažným procesem asociovaným s abdominální obezitou, jsme se v další části rozhodli pro hodnocení vztahu mezi endogenními zásobami železa a aterosklerózou použít poměr transferinový receptor/ferritin (TfR/F). Jak také naznačují výsledky naší studie, poměr TfR/F spíše než ferritin, odpovídá tradičním indikátorům chronické deplece železa – jako jsou koncentrace hemoglobinu a objem erytrocytu.

V kohortě zdravých mužů jsme v multivariační analýze potvrdili nezávislost negativní korelace mezi poměrem TfR/F se šířkou intimy-medie na arteria carotis communis na ostatních tradičních rizikových faktorech aterosklerózy. Asociace mezi feritinem a šířkou intimy-medie na společné karotické tepně naproti tomu nebyla nezávislá a byla ovlivněna parametry abdominální obezity. Navíc v porovnání s feritinem, poměr TfR/F koreloval negativně v multivariační analýze i s fibrinogenem a pozitivně s interleukinem-8. Muži s nižší expresí transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů měli horší poddajnost karotických tepen a vyšší hladiny plazmatického E-selektinu v porovnání s muži s vysokou expresí transferinových receptorů na povrchu cirkulujících monocytů. Tyto nálezy se zdají být odrazem iniciálních aterosklerotických změn na karotických tepnách.

S ohledem na prevenci kardiovaskulárních onemocnění konzumace masa pozitivně korelovala se zvýšenou hladinou feritinu, naopak pravidelná fyzická aktivita korelovala s hladinou feritinu negativně. Vyšší příjem masa není pouze zdrojem železa, ale je spojen i se zvýšenou konzumací tuků a s větší prevalencí obezity, a tak zvýšený příjem masa i nedostatek fyzické aktivity přispívají k samotnému metabolickému syndromu.

Jelikož se na zvyšování zásob železa v organizmu ve vyspělých zemích ve značné míře podílí spotřeba červeného masa a masných výrobků, mají naše pozorování význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. V doporučeních stále dominuje úprava stravovacích návyků a zvýšení fyzické aktivity. K ověření profitu z redukce zásob železa regulovanými odběry krve u pacientů s metabolickým syndromem či diabetiků 2. typu však bude nutné doplnit velké prospektivní studie.

3. POUŽITÁ LITERATURA

1. Abdalla DSP, Campa A, Monteiro HP: Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* 1992, 97: 149-159.
2. Abdalla DSP, Costa-Rosa LFBP, Monteiro HP, Campa A, Curi R: Human macrophage metabolism of low density lipoprotein oxidized by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* 1994, 107: 157-163.
3. Abraham NG, Drummond G. CD163- Mediated hemoglobin-heme uptake activates macrophage HO-1, providing an antiinflammatory function. *Circ Res* 2006, 99:911-14
4. Abuja PM, Esterbauer H: Simulation of lipid peroxidation in low-density lipoprotein by a basic "skeleton" of reactions. *Chem Res Toxicol* 1995, 8: 753-763.
5. Acosta J, Hettinga J, Fluckiger R, Krumrei N, Goldfine A, Angarita L, Halperin J: Molecular basis for a link between komplement and the vascular complications of diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:5450-5455
6. Ahluwalia N, Sun J, Krause D et al: Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older women. *Am J Clin Nutr* 2004, 79(3): 516-21.
7. Aigner E, Theurl I, Theurl M et al.: Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2008, 87: 1374–1383
8. Aleman MR, Santolaria F, Batista N, De La Vega M, Gonzalez-Reimers E, Milena A, Llanos M, Gomez-Sirvent JL: Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine* 2002, 19: 21–26.
9. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995, 26: 1235-1241.
10. Andreesen R, Brugger W, Scheibenbogen C, Kreutz M, Leser HG, Rehm A, Löhr GW: Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1990,47(6):490-7.
11. Andrews NC: Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med* 1999, 341(26): 1986-1995.
12. Andriopoulos B Jr., Corradini E, Xia Y et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Gen* 2009, 41: 482–487
13. Alexandrakis MG, Passam FH, Moschandrea IA, Christophoridou AV, Pappa CA, Coulocheri SA, Kyriakou DS: Levels of serum cytokines and acute phase proteins in patients with essential and cancer-related thrombocytosis. *Am J Clin Oncol* 2003, 26: 135–140.
14. Ansari A, Kaupke CJ, Vaziri ND, Miller R, Barbari A. Cardiac pathology in patients with end-stage renal disease maintained on hemodialysis. *Int J Artif Organs* 1993, 16: 31–36.
15. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2009, 84:353–360
16. Araujo JA , Romano EL, Brito BE et al.: Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15: 1172-1180.
17. Aristoteli LP, Möller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kritharides L. The monocytic lineage specific soluble sCD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006, 184:342–47
18. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 2002,1:1-10.
19. Arosio P, Levi S: Ferritin, iron homeostasis and oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine* 2002, 33 (4): 457–463.
20. Ascherio A, Willett WC, Rimm EB et al.: Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. *Circulation* 1994, 89(3): 969-74.
21. Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, Enav B, Shehadeh N, Kanter Y, Lache O, Cohen O, Levy NS, Levy AP: Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 2003, 92: 1193–1200.

-
22. Aso Y, Okumura K, Takebayashi K et al.: Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intimal-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003, 26(9): 2622-2627.
 23. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I: Hepcidin – central regulator of iron metabolism. *European Journal of Haematology* 2006, 78: 1-10.
 24. Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S: Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol* 1979, 95: 663–673.
 25. Awiram M : Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993, 98(1):1-9.
 26. Barron JT, Gu L, Parrillo JE.: Endothelial and nitric oxide-dependent effects on oxidative metabolism of intact artery. *Biochem Biophys Acta* 2001, 1506: 204-211.
 27. Bauersachs J, Popp R, Fleming I, Busse R: Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor: formation and interactions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997, 57: 439-446.
 28. Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991, 40:405-412
 29. Beard J, Tobin B: Iron status and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000, 72: 594--597.
 30. Björn-Rasmussen E, Hageman J, van den Dungen P et al.: Transferrin receptors on circulating monocytes in hereditary haemochromatosis. *Scand J Haematol* 1985, 34(4): 308-11.
 31. Borel MJ, Beard JL, Farrell PA: Hepatic glucose production and insulin sensitivity and responsiveness in iron-deficient anemic rats. *Am J Physiol* 1993, 264: 380–390.
 32. Bowlus CL: The role of iron in T cell development and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2003, 2(2): 73-8.
 33. Brett J, et al: Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993, 143:1699-1712
 34. Brewer HB Jr.: New features of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III lipidlowering guidelines. *Clin Cardiol* 2003, 26(Suppl 3): III19-III24.
 35. Britten M, Schachinger V: The role of endothelial function for ischemic manifestation of coronary atherosclerosis. *Herz* 1998, 23: 97-105.
 36. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988, 318:1315-1321
 37. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985, 34:938-941
 38. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A: Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking. *Science* 1986, 232:1629-1632
 39. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:6434-6438
 40. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:9441-9445
 41. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A: Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991, 87:432-438
 42. Cairo G, Recalcati S, Montosi G, Castrusini E, Conte D, Pietrangelo A. Inappropriately high iron regulatory protein activity in monocytes of patients with genetic hemochromatosis. *Blood* 1997, 89: 2546–53
 43. Camaschella C, Roetto A, Cali A et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000, 25, 14–15
 44. Celermajer DS: Noninvasive detection of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1998, 339: 2014-2015.
 45. Celermajer DS: Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998, 32(3): 29-32.
 46. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, and Krauss RM: Susceptibility of small, dense low density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern. *B Am J Med* 1993, 94(4): 350-356.
-

-
47. Chen JC, Huang KC, Lin WW: HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways. *Cell Signal*, 2006, 18: 32–39.
 48. Chen JJ. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood* 2007, 109: 2693–99
 49. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS, Chau LY: Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 2002, 111:1–8.
 50. Chitturi S, Farrell GC: Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001, 21:27-41.
 51. Clairmont KB, Czech MP: Insulin injection increases the levels of serum receptors for transferrin and insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate in intact rats. *Endocrinology* 1990, 127: 1568–1573.
 52. Conrad ME, Umbreit JN: Iron absorption: relative importance of iron transport pathways. *Am J Hematol* 2001, 67(3): 215
 53. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EGet al.: Iron absorption via the mucin-integrin mobilferrin pathway. *Trans Assoc Am Physicians* 1992, 105: 133-48.
 54. Constante M, Wang D, Raymond VA, Bilodeau M, Santos MM. Repression of repulsive guidance molecule C during inflammation is independent of Hfe and involves tumor necrosis factor- α . *Am J Pathol* 2007,170: 497-504
 55. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, Inoue J, Gonzalez FJ et al. C/EBP α regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem* 2002, 277:41163–70
 56. Cosin-Sales J, Pizzi C, Brown S, Kaski JC: C-reactive protein, clinical presentation, and ischemic activity in patients with chest pain and normal coronary angiograms. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41: 1468-1474.
 57. Cosso L, Maineri EP, Traverso N, Rosatto N, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM, Odetti P: Induction of heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic Res* 2001, 34: 189-191
 58. Crkovská J, Štípek S: Factors influencing the determination nitrites and nitrates in serum by means of nitrate ductase and Griess reagents (in Czech). *Klin Biochem Metab* 1998, 6(27): 82-87.
 59. Cussimano BL, Booth AA, Todd P, Hudson BG, Khalifah RG: Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. *Biophys Chem.* 2003, 105: 743-755
 60. Cutler P: Deferoxamine therapy in high-ferritin diabetes. *Diabetes* 1989, 38: 1207–1210.
 61. Češka a kol.: Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidémií, *Triton* 2005
 62. Davis RJ, Corvera S, Czech MP: Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1986, 261: 8708–8711.
 63. Davis BH, Zarev PV: Human monocyte sCD163 expression inversely correlates with soluble sCD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom* 2005, 63:16-22
 64. Dandona P, Hussain MA, Varghese Z, Politis D, Flynn DM, Hoffbrand AV: Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem* 1983, 20: 77–79.
 65. Deb S, Johnson EE, Robalinho-Teixeira RL, Wessling-Resnick M. Modulation of intracellular iron levels by oxidative stress implicates a novel role for iron in signal transduction. *Biometals* 2009, 22: 855–62
 66. DePalma RG, Hayes VW, Cafferata HT et al.: Cytokine signatures in atherosclerotic claudicants. *J Surg Res.* 2003, 111(2): 215-21.
 67. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P: Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005, 45:39–47.
 68. Devendra GP, Hart SA, Whitney EJ, Krasuski RA. Impact of Fibrinogen Levels on Angiographic Progression and 12-Year Survival in the Armed Forces Regression Study. *Angiology* 2010, 61:333-37
-

-
69. Dick P, Schillinger M, Minar E, Mlekusch W, Amighi J, Sabeti S, Schlager O, Raith M, Endler G, Mannhalter C, Wagner O, Exner M: Haem oxygenase-1 genotype and cardiovascular adverse events in patients with peripheral artery disease. *Eur J Clin Invest* 2005, 35: 731–737.
 70. Drüeke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM: Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002, 106(17): 2212-2217.
 71. Du X, She E, Gelbart T et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008, 320: 1088–1092.
 72. Duffy SJ, Biegelsen ES, Holbrook M, Russell JD, Gokce N, Keaney JF, Jr, Vita JA: Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, 103:2799–2804.
 73. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK et al: Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002, 105: 1158 –1161.
 74. Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Grande P et al.: Hereditary hemochromatosis and risk of ischemic heart disease: a prospective study and a case-control study. *Circulation* 2005, 112(2):185-193.
 75. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H: Endothelial receptor- mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 1989, 170:1387-1407
 76. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes* 2003, 52:1-8.
 77. Facchini FS: Effect of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care* 1998, 21:2190.
 78. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA: Effect of iron reduction in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002, 122: 931–939
 79. Facchini FS, Saylor KL: Effect of iron depletion on cardiovascular risk factors: studies in carbohydrate-intolerant patients. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 967: 342-351.
 80. Fargion S, Dongiovanni P, Guzzo A et al.: Iron and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 22: 61–63.
 81. Farrell PA, Beard JL, Druckenmiller M: Increased insulin sensitivity in irondeficient rats. *J Nutr* 1988, 118: 1104-1109.
 82. Febbraio M, Hajjar DP., Silverstein RL CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001, 108: 785–791.
 83. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD et. al.: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000,105(8):1049-1056.
 84. Feder JN, Gnirke A, Thomas W et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996, 13: 399–408
 85. Feder JN, Penny DM, Irrinki A et al.: The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(4):1472-1477.
 86. Ferrannini E: Insulin resistance, iron, and the liver. *Lancet* 2000, 355: 2181–2182.
 87. Fernández-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, Balançá R, Casamitjana-Abella R, Cabrero D, et al: Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998, 21:62-68.
 88. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W: Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002, 51: 2348–2354
 89. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W: Iron stores, blood donation and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem* 2005, 51:1201-1205.
 90. Fernandez-Real JM, Moreno JM, Lopez-Bermejo A, Chico B, Vendrell J, Ricart W: Circulating soluble transferrin receptor according to glucose tolerance status and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2007, 30: 604–608.
 91. Fojtíková I, Binková B: Determination of lipophilic vitamin A and E in plasma (in Czech). *Čas Lék Čes* 1991, 130: 112-113.
-

-
92. Ford ES, Cogswell ME: Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22: 1978-1983.
 93. Forouhi NG, Harding AH, Allison M, Sandhu MS, Welch A, Luben R, Bingham S, Khaw KT, Wareham NJ: Elevated serum ferritin levels predict new onset type 2 diabetes: results from the EPIC-Norfolk prospective study, *Diabetologia* 2007, 50: 949-956.
 94. Frings W, Dreier J, Sorg C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett* 2002, 526:93-96.
 95. Fuchs L, Ellinger I: Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic* 2004, 5(10): 725-38
 96. Gaenger H, Marschang P, Sturm W et al.: Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 2002, 40(12): 2189-2194.
 97. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C et al.: Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 2002,110(1):119-131.
 98. Ganz T. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Cancer* 2006, 46: 554-557
 99. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol* 2009, 46:387-93
 100. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008,112: 4292-97
 101. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M: BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996, 97:1422-1428
 102. Gnasso A, Irace C, Mattioli PL, Pujia A: Carotid intima-media thickness and coronary heart disease risk factors. *Atherosclerosis* 1996, 119: 7-15.
 103. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK et al.: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76(1): 333-337.
 104. Gordeuk VR, Ballou S, Lozanski G, Brittenham GM. Decreased concentrations of tumor necrosis factor-alpha in supernatants of monocytes from homozygotes for hereditary hemochromatosis. *Blood* 1992, 79:1855-60
 105. Gordeuk VR, Delanghe JR, Langlois MR et al.: Iron status and the outcome of HIV infection: an overview. *J Clin Virol* 2001, 20(3):111-115
 106. Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P et al.: Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H+/bivalent cation antiporter. *Biochem J* 2001, 354(3): 511-519.
 107. Gough PJ, Greaves DR, Suzuki H et al.: Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999,19(3): 461-471.
 108. Graham RM, Chua ACG, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007, 13(35): 4725-4736
 109. Green A, Basile R, Rumberger JM: Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism* 2006, 55: 1042-1045
 110. Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C et al.: A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med* 2001, 7(7): 840-846.
 111. Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S et al.: The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 1999,189(5): 831-841.
 112. Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C: Inflammation and Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006, 1: 297-329.
 113. Harrison EH: Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 2005;25:87-103.
 114. Hausmann D, Johnson JA, Sudhir K, Mullen WL, Friedrich G, Fitzgerald J, Chou TM, Ports TA, Kane JP, Malloy MJ, Yock PG: Angiographically silent atherosclerosis detected by intravascular ultrasound in patients with familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia: correlation with high density lipoproteins. *J Am Coll Cardiol* 1996, 27: 1562-1570.
-

-
115. Heinecke JW: Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998, 141: 1-15.
 116. Herder C, Baumert J, Thorand B, Martin S, Löwel H, Kolb H et al. Chemokines and incident coronary heart disease: results from the MONICA/ KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2147–52.
 117. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersele de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K: Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions: Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*. 1997, 100:2995–3004.
 118. Horváthová M, Pospíšilová D: Nové poznatky o homeostáze železa a jejich důsledky pro klinickou praxi. *Postgraduální medicína, ZDN, 6/2010*.
 119. Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006, 440: 944–948
 120. Hsueh WA, Quinones MJ: Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* 2003, 92(4): 10-17.
 121. Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, Yamada N: Enhanced expression of platelet- derived growth factor-beta receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 1996, 45:507-512
 122. Irvine JC, Favalaro JL, Kemp-Harder BK: NO-activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension* 2003, 41: 1301-1307.
 123. Ishizaka A, Saito K, Mori I et al.: Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25: 2282-2288.
 124. Ishizaka N, Saito K, Mitani H et al.: Iron overload augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation. *Circulation* 2002, 106, 1840-1846.
 125. Jehn ML, Guallar E, Clark JM, Couper D, Duncan BB, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Harris ZL, Pankow JS: A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 2007, 165: 1047–1054.
 126. Jiang R, Ma J, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB: Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 2004, 79: 70–75.
 127. John S, Schmieder RE: Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *Curr Hypertens Rep* 2003, 5: 199-207.
 128. Kalousova M, Skrha J, Zima T: Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002, 51(6): 597– 604.
 129. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M: Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002, 162: 221–225.
 130. Karpen CW, Cataland S, O'Dorisio TM, Panganamala RV: Production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and vitamin E status in platelets from type I human diabetic subjects. *Diabetes* 1985, 34:526-531
 131. Kartikasari AE, Georgiou NA, Visseren FL et al.: Endothelial activation and induction of monocyte adhesion by nontransferrin-bound iron present in human sera. *FASEB J* 2006, 20(2): 353-355.
 132. Kiechl S, Willet J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F: Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 1997, 96: 3300-3007.
 133. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M et al.: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002, 347: 185-192.
 134. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H: Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 1992, 90:439-446
 135. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H: Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87:9010-9014
 136. Klener et al. *Vnitřní lékařství, Galén* 1999
-

-
137. Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE et al.: Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 1999, 69(6): 1231-1236.
 138. Knutson M, Wessling-Resnick M: Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2003, 38(1): 61-88.
 139. Kodama T, Freeman M, Rohrer L. et al.: Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990, 343(6258): 531-535.
 140. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003, 349:2316-2325.
 141. Korantzopoulos P, Papaioannides D, Galaris D, Kokkoris S: Does C-reactive protein represent an oxidative stress marker in cardiovascular disease? *Int J Clin Pract* 2003, 57: 252.
 142. Koya D, King GL: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998, 47:859-866
 143. Kraml PJ, Klein RL, Huang Y et al.: Iron loading increases cholesterol accumulation and macrophage scavenger receptor I expression in THP-1 mononuclear phagocytes. *Metabolism* 2005, 54(4): 453-459.
 144. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al.: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001,409(6817): 198-201.
 145. Kruszewski M: The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochimica Polonica* 2004, 2(51), 471-480.
 146. Kyriakis JM, Avruch J: Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 1996, 271:24313--24316.
 147. Langer A, Constance C, Fodor JG, Frohlich JJ, Gregoire J, Lau DC, Leiter LA, Mancini GB, Marr D, McPherson R, O'Neill BJ, Rabkin SW: Statin therapy and the management of acute coronary syndromes. *Can J Cardiol* 2003, 19: 921-927.
 148. Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, Ucchino S, Neri M, Giamberardino MA, Cucurullo F. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007, 42: 492-498.
 149. Leboeuf RC, Tolson D, Heinecke JW. et al.: Dissociation between tissue iron concentrations and transferrin saturation among inbred mouse strains. *J Lab Clin Med* 1995,126(2):128-36.
 150. Lee DH, Folsom AR, Jacobs DR Jr.: Dietary iron intake and Type 2 diabetes incidence in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Diabetologia* 2004, 47: 185-194.
 151. Lee DH, Liu DY, Jacobs DR Jr.,Shin HR, Song K, Lee IK, Kim B, Hider RC: Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006, 29: 1090-1095.
 152. Lee HT, Chiu LL, Lee TS, Tsai HL, Chau LY. Dietary iron restriction increases plaque stability in apolipoprotein-e-deficient mice. *J Biomed Sci* 2003, 10: 510-517.
 153. Lee P, PengH,Gelbart T, Wang L, BeutlerE. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102 : 1906-10
 154. Lee TS, Shiao MS, Pan CC et al: Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoEdeficient mice. *Circulation* 1999, 99: 1222-1229.
 155. Legrand D, Elass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005,62: 2549-59
 156. Lekakis J, Papamicheal C, Stamatelopoulos K, Cimponeriu A, Voutsas A, Vemmos K, Mavrikakis M, Stamatelopoulos S: Hemochromatosis associated with endothelial dysfunction: evidence for the role of iron stores in early atherogenesis. *Vasc Med* 1999, 4: 147-148.
 157. Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy NS, Asaf R, Guetta J, Yang C, Purushothaman KR, Fuster V, Moreno PR. Haptoglobin genotype is a determinant of iron, lipid peroxidation, and macrophage accumulation in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:134-140.
-

-
158. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP: Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998, 21:2191–2192.
 159. Li W, Xu LH, Forssell C, Sullivan JL, Yuan XM. Overexpression of transferrin receptor and ferritin related to clinical symptoms and destabilization of human carotid plaques. *Exp Biol Med* 2008, 233:818–26.
 160. Li W, Xu LH, Yuan XM. Macrophage hemoglobin scavenger receptor and ferritin accumulation in human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1030: 196–201.
 161. Liao JK: Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998, 44: 1799-1808.
 162. Liu X, Wei J, Peng DH, Layne MD, Yet SF: Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice. *Diabetes* 2005, 54: 778-84
 163. Liu S, Suragani RN, Wang F, Han A, Zhao W, et al. The function of heme-regulated eIF2 α kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. *J Clin Invest* 2007 117:3296–305
 164. Libby P, Ridker PM, Maseri A.: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135–43
 165. Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, Zhou ZM, Zhou M, Xie D, Wang GB, Zhang X: Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Atherosclerosis Through Promoting Oxidative Stress and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26: 1156-1162
 166. Lubrano V, Vassalle C, Blandizzi C, Del Tacca M, Palombo C, L'Abbate A, Baldi S, Natali A. The effect of lipoproteins on endothelial nitric oxide synthase is modulated by lipoperoxides. *Eur J Clin Invest* 2003, 33: 117-125.
 167. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J: Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation* 2008, 117:754-761.
 168. Magnusson MK, Sigfusson N, Sigvaldason H et al.: Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1994, 89(1):102-108.
 169. Mainous AG 3rd, Wells BJ, Everett CJ, Gill JM, King DE. Association of ferritin and lipids with C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2004, 93:559-62
 170. Mascitelli L, Pezzetta F, Goldstein MR. Iron, metabolic syndrome, nonalcoholic fatty liver disease and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008, 205:39-40
 171. Mauriello A, Sangiorgi G, Palmieri G, Virmani R, Holmes DR Jr, Schwartz RS, et al. Hyperfibrinogenemia is associated with specific histocytological composition and complications of atherosclerotic carotid plaques in patients affected by transient ischemic attacks. *Circulation* 2000, 101:744 –50.
 172. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, et al: Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999, 117:1155-1163.
 173. Merzouk S, Hichami A, Sari A, Madani S, Merzouk H, Yahia Berrouiguet A, Lenoir-Rousseaux JJ, Chabane-Sari N, Khan NA: Impaired oxidant/antioxidant status and LDL-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients. *Gen Physiol Biophys* 2004, 23: 387-99
 174. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009, 41:478–81
 175. Minqin R, Watt F, Huat BT, Halliwell B. Correlation of iron and zinc levels with lesion depth in newly formed atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med* 2003, 34:746–752.
 176. Minqin R, Rajendran R, Pan N, Kwong-Huat TB, Ong WY, Watt F, Halliwell B. The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Biol Med* 2005, 38:1206–1211.
 177. Miura K, Nagakawa H, Ueshima H, Okayama A, Saitoh S, Curb JD, et al. Dietary factors related to higher plasma fibrinogen levels in Japanese-Americans in Hawaii compared with Japanese in Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:1674-79
 178. Moestrup SK, Möller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 2004, 36:347–54.
 179. Mojiminiyi OA, Marouf R, Abdella NA: Body iron stores in relation to the metabolic syndrome, glycemic control and complications in female patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008, 18: 559-566
-

-
180. Montosi G, Donovan A, Totaro A et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001, 108: 619–623
 181. Moore M, Folsom AR, Barnes RW et al.: No association between serum ferritin and asymptomatic carotid atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 1995, 141(8): 719-723
 182. Moura E, Noordermeer MA, Verhoeven N, Verheul AF, Marx JJ. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. *Blood* 1998, 92: 2511–19
 183. Nabel E, Shum L, Pompili V, Yang Z-Y, San H, Shu H, Liptay S, Gold L, Gordon D, Derynck R, et al: Direct transfer of transforming growth factor b1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:10759-10763
 184. Nanami M, Ookawara T, Otaki Y, Ito K, Moriguchi R, Miyagawa K, Hasuike Y, Izumi M, Eguchi H, Suzuki K, Nakanishi T. Tumor necrosis factor- α -induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:2495–2501.
 185. Nečas E, Vokurka M, Krijt J, Šulc K. Hpcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006, 55(6): 667-674.
 186. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004, 113:1271–76
 187. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al.: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004, 306(5704): 2090-2093.
 188. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002, 110:1037–44
 189. Niederau C, Berger M, Stremmel W et al.: Hyperinsulinemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation? *Diabetologia* 1984, 26: 441–444
 190. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000, 404:787–790
 191. Oliveira SJ, Pinto JP, Picarote G, Costa VM, Carvalho F et al. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBP α activity. *PLoS One* 2009, 4: e6618
 192. Omara FO, Blakley BR. The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br J Nutr* 1994, 72:899–909
 193. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM: Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001, 357: 241-247
 194. Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H et al.: Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2007, 170: 967–980
 195. Pácal L, Kaňková K: New knowledge on iron metabolism and its disorders. *Cas Lek Cesk* 2004,143(1): 9-14
 196. Pak M, Lopez MA, Gabayan V et al.: Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006, 108(12): 3730-5
 197. Pang JH, Jiang MJ, Chen YL, Wang FW, Wang DL, Chu SH, Chau L. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1996, 97:2204–2212
 198. Papadaki H, Kyriakou D, Foudoulakis A, Markidou F, Alexandrakis M, Eliopoulos GD: Serum levels of soluble IL-6 receptor in multiplemyeloma as indicator of disease activity. *Acta Haematol* 1997, 97: 191–195
 199. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004, 36, 77–82
 200. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005, 105, 4103–4105
 201. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL: The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med* 1992, 43: 219-225
-

-
202. Pawelczyk E, Arbab AS, Pandit S, Hu E, Frank JA: Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* 2006, 19:581–592
 203. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanetz H et al: A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997, 272: 29911-29918
 204. Peng K, Wu X, Zhao H and Sun Y: Advanced oxidation protein products induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 mitogenactivated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells *Chin Med J* 2006, 119(13):1088-1093.
 205. Pereira EC, Bertolami MC, Faludi AA, Salem M, Bersch D, Abdalla DS: Effects of simvastatin and L-arginine on vasodilation, nitric oxide metabolites and endogenous NOS inhibitors in hypercholesterolemic subjects. *Free Radic Res* 2003, 37: 529-536.
 206. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* 2006, 107:3727–32
 207. Pietrangelo A. Molecular insights into the pathogenesis of hereditary haemochromatosis. *Gut* 2006, 55: 564–68
 208. Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP α . *Blood* 2008, 111: 5727–33
 209. Ponka P: Recent Advances in Cellular Iron Metabolism. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 2003, 16: 201-217
 210. Ponka P, Lok CN : The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31: 1111-1137
 211. Ponraj D, Makjanic J, Thong PS, Tan BK, Watt F: The onset of atherosclerotic lesion formation in hypercholesterolemic rabbits is delayed by iron depletion. *FEBS Lett* 1999, 459: 218–222
 212. Potashnik R, Kozlovsky N, Ben-Ezra S et al.: Regulation of glucose transport and GLUT-1 expression by iron chelators in muscle cells in culture. *Am J Physiol* 1995, 269: 1052–1058
 213. Rajpathak S, Ma J, Manson J, Willett WC, Hu FB: Iron intake and the risk of type 2 diabetes in women: a prospective cohort study. *Diabetes Care* 2006, 29:1370–1376
 214. Rauramaa R, Väisänen S, Mercuri M et al.: Association of risk factors and body iron status to carotid atherosclerosis in middle-aged eastern Finnish men. *Eur Heart J* 1994, 15(8): 1020 -1027
 215. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D , Witztum JL: Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 701–706
 216. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL : Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993, 91: 668–676
 217. Reaven P, Witztum JL: Comparison of supplementation of RRR-alpha-tocopherol and racemic alpha tocopherol in humans. Effects on lipid levels and lipoprotein susceptibility to oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 601-608
 218. Redmon JB, Pyzdrowski KL, Robertson RP: No effect of deferoxamine therapy on glucose homeostasis and insulin secretion in individuals with NIDDM and elevated serum ferritin. *Diabetes* 1993, 42: 544–549
 219. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000, 101:1767–1772
 220. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* 2008, 453: 702–17
 221. Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004, 104: 4294–99
 222. Roest M, van der Schouw YT, de Valk B et al.: Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 1999, 100(12):1268-1273
-

-
223. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003, 33, 21–22
224. Rogers JT: Ferritin translation by interleukin-1 and interleukin-6: The role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood* 1996, 87: 2525-2537
225. Rohrer L, Freeman M, Kodama T et. al. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature* 1990, 343(6258): 570-572
226. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362: 801-809
227. Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* 2005,12:107–11
228. Sabeti S, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Quehenberger P, Rumpold H, et al.: Prognostic impact of fibrinogen in carotid atherosclerosis : nonspecific indicator of inflammation or independent predictor of disease progression? *Stroke* 2005, 36:1400-04
229. Salonen JT, Tuomainen TP, Nyysönen K, Lakka HM, Punnonen K: Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 1998, 317: 727
230. Salonen JT, Nyysönen K, Korpela H et al.: High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992, 86(3): 803-811.
231. Sampson MJ, Davies IR, Braschi S et al.: Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003,167(1):129-134.
232. Sarnak MJ: Cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003, 41(5):11–17
233. Sartori M, Rigamonti C, Andorno S et al.: Iron, hepatic stellate cells and fibrosis in chronic hepatitis C. *Eur J Clin Invest* 2002, 32(1): 28-35
234. Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res* 2006, 99:943–950
235. Sharma N, Laftah AH, Brookes MJ, Cooper B, Iqbal T, Tselepis C. A role for tumor necrosis factor alpha in human small bowel iron transport. *Biochem J* 2005, 390:437–46
236. Sharp P, Srai SK. The molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Gastroenterol* 2007, 13(35): 4716-4724
237. Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zon LI, Paw BH: Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 2006, 440(7080): 96-100
238. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS et al.: Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005, 122(5): 789-801
239. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994,14:1521-1528
240. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D: Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995, 96:1395-1403
241. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates HFE-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2008, 7:205–14
242. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D: Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993, 91:2155-2168
243. Silvestrii L, Pagani A, Nai A et al. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008,8: 502–511
244. Slentz CA, Aiken LB, Houmard JA, Bales CW, Johnson JL, Tanner CJ, Duscha BD et al: Inactivity, exercise and visceral fat. STRRIDE: a randomized controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol* 2005, 99: 1613-1618
-

-
245. Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 1992, 286: 901–905
246. Sorensen K, Celermajer DS, Spiegelhalter D, Georgopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE: Non-invasive measurement of endothelium dependent arterial responses in man: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995, 74: 247-253
247. Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:949–954
248. Stampfer MJ, Grodstein F, Rosenberg I et al.: A prospective study of plasma ferritin and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1993, 87: 688-688. Abstract.
249. Steinbrecher UP, Witztum JL: Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 1984, 33:130-134
250. Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS et al.: Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med* 1988, 319(16): 1047-1052
251. Sullivan JL: Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1981,1(8233):1293-1294
252. Sullivan JL, Zacharski LR. Hereditary haemochromatosis and the hypothesis that iron depletion protects against ischemic heart disease. *Eur J Clin Invest* 2001, 31: 375–377
253. Sullivan JL. Stored iron and vascular reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25: 1532–1535
254. Sullivan JL. Macrophage, Iron, Hpcidin and atherosclerotic plague stability. *Exp Biol Med* 2007, 232: 1014-1020
255. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al.: Serum thioredoxin elucidates the significance of serum ferritin as a marker of oxidative stress in chronic liver diseases. *Liver* 2001, 21: 295–299
256. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al.: Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003, 38: 32–38
257. Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV: The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care* 2007, 7:1926–1933.
258. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J: Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006, 52(6): 950-968
259. Syrovátka P, Kraml P: Infekce a ateroskleróza, *Vnitřní lékařství* 2007, 53(3): 286-291
260. Suzukawa M, Ishikawa T, Yoshida H, Nakamura H: Effect of in-vivo supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein to oxidative modification. *J Am Coll Nutr* 1995, 14: 46-52
261. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007,13, 1096–1101
262. Tanno T, Porayette P, Sripichai O et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009, 114: 181–186
263. Testa U, Kühn L, Petrini M, Quaranta MT, Pelosi E, Peschle C: Differential regulation of iron regulatory element-binding protein(s) in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages. *J Biol Chem* 1991, 266: 3925-3930
264. Testa U, Petrini M, Quaranta MT, Pelosi-Testa E, Mastroberardino G, Camagna A, Boccoli G, Sargiacomo M, Isacchi G, Cozzi A, Arosio P, Peschle C: Iron up-modulates the expression of transferrin receptors during monocyte-macrophage maturation. *J Biol Chem* 1989, 264:181-187
265. THIRD REPORT of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002, 106: 3143-3421
266. Timothy PR, Aust SD: The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* 1992, 22: 119-141
267. Thomas MJ, Rudel LL: Dietary fatty acids, low density lipoprotein composition and oxidation and primate atherosclerosis. *J Nutr* 1996, 126: 1058-1062
-

-
268. Thong PS, Selley M, Watt F. Elemental changes in atherosclerotic lesions using nuclear microscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 1996, 42: 103–110
269. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002, 99: 3505-3516
270. Torti SV, Kwak EL, Miller SC et al.: The molecular cloning and characterization of ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor inducible gene. *J Biol Chem* 1988, 263: 12638-12644
271. Tousoulis D, Tentolouris C, Crake T, Toutouzas P, Davies G: Basal and flow-mediated nitric oxide production by atheromatous coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1997,6: 1256-1262
272. Tribble DL, Van den Berg JJ, Motchnik PA., Ames BN, Lewis DM, Chait A, Krauss RM: Oxidative susceptibility of low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and alpha-tocopherol content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(3): 1183–1187
273. Trombini P, Piperno A: Ferritin, metabolic syndrome and NAFLD: elective attractions and dangerous liaisons. *J Hepatol* 2007, 46: 549-552
274. Tuomainen NP, Nyysönen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T et al: Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care* 1997, 20: 426–428
275. Tuomainen TP, Punnonen K, Nyysönen K, Salonen JP: Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 1998, 97: 1461-1466
276. Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K et al.: Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 1999,100(12):1274-1279
277. Tuomainen TP, Salonen R, Nyysönen K et al.: Cohort study of relation between donating blood and risk of myocardial infarction in 2682 men in eastern Finland. *BMJ* 1997,314(7083):793-794
278. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 172–8
279. Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Moorkens G, De Block C, Manuel-y-Keenoy B: Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 2006, 40:1749-55
280. Van der A DL, Marx JJ, Grobbee DE et al.: Non-transferrin-bound iron and risk of coronary heart disease in postmenopausal women. *Circulation* 2006,113(16):1942-1949
281. Van der A DL, Peeters PH, Grobbee DE et al. : Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *Eur Heart J* 2005, 26(3): 257-262
282. Van Jaarsveld H, Pool GF: Beneficial effects of blood donation on high density lipoprotein concentration and the oxidative potential of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2002, 161(2): 395-402
283. Vanizor B, Orem A, Karahan SC, Kiran E, Erem C, Aliyazicioglu R, Uydu HA: Decreased nitric oxide end-products and its relationship with high density lipoprotein and oxidative stress in people with type 2 diabetes without complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2001, 54(1): 33-39
284. Vari IS, Balkau B, Kettaneh A, Andre P, Tichet J, Fumeron F, Caces E, Marre M, Grandchamp B, Ducimetiere P: Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care* 2007, 30: 1795–1801
285. Vidal S, Cellier M, Govoni G et al.: Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 1994,180(5):1741-1752
286. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A: Cachectin/ TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988, 240:1546-1548
287. Wang RH, Li C, Xu X et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2005, 2, 399–409
288. Wang Y, , Beydoun MA: Meat consumption is associated with obesity and central obesity among US adults. *Int J Obes* 2009, 24: 1-8.
-

-
289. Ward PP, Mendoza-Meneses M, Cunningham GA, Conneely OM. Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol Cell Biol* 2003, 23:178–85
290. Watt F, Rajendran R, Ren MQ, Tan BKH, Halliwell B. A nuclear microscopy study of trace elements Ca, Fe, Zn and Cu in atherosclerosis. *Nucl Instrum Methods Phys Res* 2006, 249: 646–652
291. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, et al: Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:7742-7746
292. Weiss G: Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* 2002, 32(1): 70-78
293. Williams MJA, Poulton R, Williams S: Relationship of serum ferritin with cardiovascular risk factors and inflammation in young men and women. *Atherosclerosis* 2002, 165: 179-184
294. Wilson JG, Lindquist JH, Grambow SC, Crook ED, Maher JF: Potential role of increased iron stores in diabetes. *Am J Med Sci* 2003, 325: 332–339
295. Wiseman S. A., Van den Boom M. A., De Fouw N. J., Wassink M. G., Op den Kamp J. A., Tijburg L. B. Comparison of the effects of dietary vitamin E on in vivo and in vitro parameters of lipid peroxidation in the rabbit. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 617-626
296. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin CH, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313
297. Wolff SP: Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993, 49: 642–652
298. Wolff B, Völzke H, Lüdemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A, et al. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke* 2004; 35:453–7
299. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006, 108: 3204-3209
300. Xiong S, She H, Takeuchi H, Han B, Engelhardt JF, et al. Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003, 278:17646–54
301. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/ binding proteins. *J Biol Chem* 1994, 269:9889-9897
302. Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, and Haile DJ. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J Biol Chem* 2002, 277: 39786–39791
303. Yale JF, Grose M, Seemayer TA, Marliss EB: Diabetes prevention in BB rats by frequent blood withdrawal started at a young age. *Diabetes* 1988, 37: 327–333
304. Yasunari K, Maeda K, Nakamura M: Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reactive protein. *Hypertension* 2002, 39: 777-780
305. Yki-Jarvinen H: Insulin resistance and endothelial dysfunction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, 17: 411-430
306. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T: Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995, 38: 201-210
307. You SA, Wang Q: Ferritin in Atherosclerosis. *Clinical Chimica Acta* 2005, 357: 1-16
308. Young IS, McEneny J: Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* 2001, 29 (2): 358-362
309. Yuan XM, Brunk UT, Olsson AG et al.: Effects of iron- and hemoglobin-loaded human monocyte-derived macrophages on oxidation and uptake of LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15(9):1345-51
310. Yuan XM, Anders WL, Olsson AG, Brunk UT. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis* 1996, 124:61-73
-

-
311. Yuan XM, Li W, Baird SK, Carlsson M, Melefors O. Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins. *Free Radic Res* 2004, 38:1133–1142
 312. Yue DK, McLennan S, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Ross GR, Turtle JR: Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes. *Diabetes* 1989, 38:257-261
 313. Zacharski LR, Chow BK, Howes PS et al.: Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007, 297(6): 603-610
 314. Zhang WJ, Frei B Intracellular metal ion chelators inhibit TNFalpha-induced SP-1 activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2003, 34(6): 674-682
 315. 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: 1577–1583
 316. Zima a kol. Laboratorní diagnostika, *Galén* 2002

4. SEZNAM PUBLIKACÍ

Impaktované publikace *in extenso* ve vztahu k dizertační práci:

Kraml P, **Syrovátka P**, Štípek S, Fialová L, Kopřivová H, Potočková J, Anděl M: Hyperlipoproteinemia impairs endothelium-dependent vasodilation. *Physiol Res* 53: 471-480, 2004 (**IF: 1.14**)

Syrovátka P, Kraml P, Potočková J, Fialová L, Vejražka M, Crkovská J, Anděl M: Relationship between increased body iron stores, oxidative stress and insulin resistance in healthy men. *Ann Nutr Metab* 2009;54:268-274 (**IF: 1,97**)

Syrovátka P, Kraml P, Hulíková K, Fialová L, Vejražka M, Crkovská J, Potočková J, Anděl M: Iron stores are associated with asymptomatic atherosclerosis in healthy men of primary prevention. Článek přijat k publikaci do časopisu *European Journal of Clinical Investigation* dne 29.12.2010. (**IF: 2,64**)

Impaktované publikace *in extenso* bez vztahu k dizertační práci:

Al-Hiti H, Melenovský V, **Syrovátka P**, Kettner J, Málek I, Kautzner J: Sildenafil is more selective pulmonary vasodilator than prostaglandin E(1), in patients with pulmonary hypertension due to heart failure. *Physiol Res* 2010, Nov 29 (Epub ahead of print) (**IF: 1,43**)

Melenovský V, Al-Hiti H, Kazdová L, Jabor A, **Syrovátka P**, Málek I, Kettner J, Kautzner J: Transpulmonary B-Type Natriuretic Peptide Uptake and Cyclic Guanosine Monophosphate Release in Heart Failure and Pulmonary Hypertension The Effects of Sildenafil. *J Am Coll Cardiol* 2009 Aug 11;54(7):595-600 (**IF: 12.64**)

Publikace neimpaktované *in extenso* ve vztahu k dizertační práci:

Kraml P, **Syrovátka P**: Zkušenosti s měřením endotel dependentní vazodilatace pomocí duplexní sonografie. *Praktický lékař* 2004, 84(2): 66-68

Syrovátka P, Kraml P: Infekce a ateroskleróza. *Vnitřní lékařství* 53 (3): 286-291, 2007 (přehledový článek)

Abstrakty v časopisech:

Syrovátka P, Kraml P, Fialová L, Potočková J, Anděl M: PAPP-A potenciální laboratorní ukazatel endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004, 7, Suppl.2, s.49 (bez IF)

Kraml P, **Syrovátka P**, Brunerová L, Šmejkalová V, Potočková J, Anděl M: Ferritin and insulin resistance. *Diabetologia* 2004, 47 (1), s. A228 (IF: 5.583)

Kraml P, **Syrovátka P**, Kopřivová H, Potočková J, Anděl M: Elevated iron stores contribute to endothelial dysfunction. *Atherosclerosis Supplements* 2005, 6 (1), s. 158 (IF 8.963)

Kraml P, **Syrovátka P**, Potočková J, Crkovská J, Vejražka M, Anděl M: Homa index a laboratorní ukazatele oxidačního stresu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005, 8, Suppl. 3, s. 26 (bez IF)

Kraml P, Syrovátka P, Potočková J, Anděl M: Rizikové faktory aterosklerózy u pacientů s náhodně zjištěnou poruchou lačné glykémie. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005, 8, Suppl.1, s. 30 (bez IF)

Cabáňik P, **Syrovátka P**, Potočková J, Fialová L, Kraml P: Korelace 10 letého rizika kardiovaskulární mortality podle tabulek SCORE s ukazateli endotelové dysfunkce v kohortě mužů primární prevence. *Vnitřní lékařství* 2007, 53 (12), s. 1363-1364 (bez IF).

Kraml P, Syrovátka P, Fialová L, Crkovská J, Vejražka M, Potočková J, Anděl M: Interleukin 8 (US) jako časný ukazatel aterosklerózy. *Vnitřní lékařství* 2007, 53(12), s. 1348 (bez IF)

Kraml P, **Syrovátka P**, Fialová L, Potočková J, Anděl M: Markers of endothelial dysfunction and inflammation in asymptomatic subjects at increased oxidation stress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2007, 27 (6), s. E70 (IF:7.221)

Syrovátka P, Kraml P, Potočková J: Aterogenní index plazmy odráží morfologické změny na karotických tepnách již v asymptomatickém období aterosklerózy. *Cor et Vasa* 2007, 49(4), Suppl., s. 106 (bez IF)

Kraml P, **Syrovátka P**, Hulíková K, Potočková J, Anděl M: Expression of macrophage transferin receptor (CD71) and markers of carotid elasticity and endothelial dysfunction in primary prevention in men. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2008, 28 (6), s. E143 (IF: 6.858)

Kraml P, **Syrovátka P**, Potočková J, Hašpicová M, Anděl M: Sonografická diagnostika subklinické aterosklerózy karotických tepen u mužů primární prevence. *Vnitřní lékařství* 2008, 54(12), s. 1213 (bez IF)

5. SOUHRN POUŽITÝCH ZKRATEK

AGE	advanced glycation endproducts	IRE	iron regulatory element
Anti oxLDL	anti-oxLDL antibodies	IRP	iron regulatory protein
AOPP	advanced oxidation protein products	MCP	monocyte chemoattractant protein 1
ApoA1	apolipoprotein A1	M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
ApoB	apolipoprotein B	MCV	mean cell volume
ALT	alanine aminotransferase	MPO	myeloperoxidase
AST	aspartate aminotransferase	MSR	macrophage scavenger receptor
ATP	adenosin triphosphate	NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
BFGF	fibroblast growth factor	NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfát
BMI	body mass index	NAFLD	non-alcoholic fat liver disease
BMP	bone morphogenetic protein	NASH	non-alcoholic steatohepatitis
CAC	compliance arteria carotis	NTBI	non-transferrin binding iron
CD36	cluster of differentiation 36	LDL	low density lipoprotein
CD71	cluster of differentiation 71	LIP	labilní intracelulární pool železa
CD163	cluster of differentiation 163	Lp(a)	lipoprotein (a)
hsCRP	high-sensitivity C-reactive protein	NF-κB	nuclear factor-kappa B
Dcytb	duodenal cytochrome b	NO	oxid dusnatý
DMT-1	divalent metal transporter	NOS	syntáza oxidu dusnatého
DNA	deoxyribonukleová kyselina	oxβ2GPI	oxidised β_2 -glycoprotein I
DTK	diastolický krevní tlak	OxLDL	oxidized LDL
EDHF	endothelium derived hyperpolarization factor	PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
ESEL	E-selectin	PGE	prostaglandin E
ET-1	endotelin 1	PGI-2	prostaglandin I2
FW	sedimentace	PBS	phosphate buffer saline
GLUT-1	glucose transporter 1	PSV	peak systolic velocity
GTP	guanosin triphosphate	RNA	ribonukleová kyselina
HCP-1	hem carrier protein 1	ROS	reactive oxygen species
HDL	high density lipoprotein	STK	systolický krevní tlak
HFE	hemochromatosis protein	TC	total cholesterol
HJV	hemojuvelin	TfR/F	plasma circulating transferrin receptor concentration to plasma ferritin concentration ratio
HO	hemoxygenáza	TGF-β	transforming growth factor beta
HOMA-IR	insulin resistance index	TIBC	total iron-binding capacity
HSP	heat shock protein	TG	triglycerides
IACC	common carotid intima-media thickness	TLR-4	toll like receptor 4
ICAM-1	intercellular cytoadhesive molecule	TNF-α	tumor necrosis factor alpha
IFN-γ	interferon gamma	TPA	tissue plasminogen activator
IGF-1	insulin like growth factor 1	VCAM-1	vascular cytoadhesive molecule
IL-1β	interleukin 1 β	VEGF	vascular endothelial growth factor
IL-6	interleukin 6	vWf	von Willebrand factor
IL-8	interleukin 8	WHR	waist-to-hip ratio
IL-10	interleukin 10		
Inos	inducibilní syntáza NO		