

Abstrakt

Železo je esenciální stopový prvek pro většinu známých organismů. Nadbytek železa v buňkách a tkáních však vede k jejich poškození. Nejčastěji dochází k poškození parenchymatických orgánů, jako jsou játra, pankreas či srdce.

Náplní této diplomové práce bylo vytvořit buněčné in vitro modely pro zkoumání vlivu nadbytku železa u hepatocytů a pankreatických beta buněk a na těchto modelech zkoumat děje, které při nadbytku železa vedou k buněčnému poškození. Zaměřili jsme se na zkoumání přítomnosti oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula a aktivaci apoptotické buněčné smrti. K experimentům jsme používali buňky buněčné linie HEP-G2 zastupující lidské hepatocyty a linie NES2Y zastupující lidské pankreatické beta buňky.

Pro studium mechanismů buněčného poškození v důsledku nadbytku železa jsme použili dva přístupy, pomocí nichž jsme sledovali jak akutní, tak dlouhodobý vliv vysokých hladin železa na poškození vybraných buněčných linií. Při studiu akutního vlivu nadbytku železa jsme na buňky aplikovali vysoké dávky železa (za použití 15 mM citrátu železitého v médiu), které vedly k aktivaci buněčné smrti během kultivace buněk v řádu hodin. Dlouhodobý vliv nadbytku železa jsme sledovali u buněk pravidelně kultivovaných v přítomnosti 50 μ M a 100 μ M citrátu železitého po dobu několika měsíců. Koncentrace železa v podobě citrátu železitého použité při dlouhodobé kultivaci buněk odpovídaly běžně dosažitelným hodnotám koncentrace železa v plasmě při nadbytku železa u člověka.

Během kultivace buněk při akutních vysokých dávkách železa jsme u obou sledovaných buněčných linií pozorovali aktivaci iniciačních i exekučních kaspáz, doprovázenou signifikantním snížením množství buněk oproti kontrole. Poprvé jsme přitom poukázali na možnou roli kaspázy-2 při reakci buněk na nadbytek železa. Jako možnou příčinu aktivace kaspáz jsme v buňkách detekovali známky probíhajícího oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula. U dlouhodobě kultivovaných buněk v přítomnosti nadbytku železa jsme již po jednom měsíci kultivace zaznamenali pomalejší růst buněk oproti kontrolním buňkám obou testovaných linií. U těchto buněk jsme pozorovali zvýšenou aktivaci exekučních kaspáz a kaspázy-2 bez výraznějších známek přítomnosti oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula.

Naše výsledky tak přispívají k poznání molekulárních mechanismů působení nadbytku železa na vybrané buněčné linie. Během kultivace buněk při nadbytku železa jsme pozorovali vyšší hladinu oxidativního stresu, stresu endoplasmatického retikula

a aktivaci apoptotické signalizace. Navíc jsme během krátkodobé i dlouhodobé kultivace při nadbytku železa zaznamenali aktivaci kaspázy-2, jejíž role bude předmětem dalšího zkoumání.

Klíčová slova: Nadbytek železa, NES2Y, HEP-G2, apoptóza, oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula, kaspáza-2