

Ovlivnění metabolismu kostí u potkanů opakovanými krevními odběry a dietou obohacenou o železo

Švejková K.^{1,2}, Doubková K.², Živná H.¹, Živný P.², Palička V.²

¹Vivárium a Radioizotopové laboratoře, LF UK Hradec Králové

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOUHRN

Cíl studie: Sledovat vliv opakovaných krevních odběrů a diety obohacené o železo na kostní metabolismus u samic potkanů kmene Wistar.

Typ studie: Základní výzkum.

Název a sídlo pracoviště: Vivárium a radioizotopové laboratoře, LF UK Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Materiál a metody: Potkani byli po dobu 8 týdnů krmeni standardní laboratorní dietou (SLD, 27 mg Fe/kg diety) nebo dietou obohacenou o železo (FE, 400 mg Fe/kg diety). Týdně byl proveden odběr (w) 0,5 ml krve/100 g tělesné hmotnosti, celkem 8krát. Skupiny: 1. kontrolní skupina SLD; 2. kontrolní skupina FE; 3. SLD-w; 4. FE-w. V krvi byl stanoven krevní obraz, respirační vzplanutí (RB), v séru koncentrace prohepcidinu a železa, v játrech koncentrace železa. Z kostních ukazatelů jsme stanovili: osteokalcin (OC), N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP), C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CTx) a tartát-rezistentní kyselou fosfatázu (TRACP). Byla změřena kostní minerální hustota (BMD).

Výsledky: U skupin s krevními odběry bylo vyšší spontánní RB a železo v séru, naopak došlo k poklesu sérového prohepcidinu, hemoglobinu i železa v játrech ve srovnání s SLD a FE, u FE-w bylo také vyšší stimulované RB. Hodnoty PINP ($p < 0,05$), CTx ($p < 0,05$) a TRAP ($p < 0,05$) vzrostly u SLD-w ve 3. týdnu a u FE-w v 1. týdnu, hodnoty OC ($p < 0,05$) vzrostly pouze u FE-w v 1. týdnu, poté všechny hodnoty poklesly na hodnoty SLD a FE. BMD vzrostla po odběrech v bederní a ocasní oblasti ($p < 0,01$).

Závěr: Opakované krevní odběry a dieta obohacená o železo vedly k vyšší reaktivitě buněk makrofágového systému, k vyšší aktivitě osteoklastů, ke stimulaci osteoblastů s následným pozitivním vlivem na kvalitu kostní tkáně.

Klíčová slova: odběr krve, železo, osteokalcin, N-terminální propeptid prokolagenu typu I, C-terminální telopeptid kolagenu typu I.

SUMMARY

Švejková K., Doubková K., Živná H., Živný P., Palička V.: Bone metabolism affected by blood withdrawals and iron enriched diet in rats

Objective: We studied the influence of repeated blood withdrawals and iron enriched diet on biochemical markers of bone metabolism in male Wistar rats.

Design: Basic research.

Settings: Radioisotope Laboratories and Vivarium, Charles University, Medical Faculty, Hradec Kralove, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital, Hradec Kralove.

Material and Methods: Rats were fed for 8 weeks with standard laboratory diet (SLD, 27mg Fe/kg diet) or iron enriched diet (FE, 400 mg Fe/kg diet) and had blood withdrawals (w) 0.5 ml/100 g body weight, 8 times. Animals were divided into 4 groups: 1. Control group SLD; 2. Control group FE; 3. SLD-w; 4. FE-w. The following items were assessed in blood; haemoglobin concentration and respiratory burst (RB), iron stores in liver tissue. In serum were evaluated prohepcidin, iron and bone metabolism markers: osteocalcin (OC), N-terminal propeptide of procollagen I (PINP), C-terminal telopeptide of collagen I (CTx) and tartrate resistant acid phosphatase (TRACP). Bone mineral density (BMD) was measured.

Results: Spontaneous RB and iron in serum increased in animals with repeated blood withdrawals, but serum prohepcidin, haemoglobin concentration and iron in liver decreased vs. SLD and FE, but in FE-w animals increased stimulated RB, too. Values of PINP ($p < 0.05$), CTx ($p < 0.05$) and TRAP ($p < 0.05$) increased by SLD-w in 1st week and by FE-w in 3rd week, values of OC ($p < 0.05$) increased only by FE-w, but then all these values decreased to values of SLD and FE. BMD increased by blood withdrawals in femur ($p < 0.01$) and lumbar part ($p < 0.01$).

Conclusion: Repeated blood withdrawals and iron enriched diet contributed to stimulation reactivity of scavenger cells, elevation activity of osteoclast, stimulation of osteoblast with subsequent positive effect on quality of bone tissue.

Key words: blood withdrawal, iron, osteocalcin, N-terminal propeptide of procollagen I, C-terminal telopeptide of collagen I.

Úvod

Remodelace kosti je neustále se opakující děj, ve kterém osteoklasty odbourávají starou kost (osteoresorpce) a osteoblasty syntetizují kost novou (osteofornace). Osteoblasty vznikají z pluriopotentních mezenchymových buněk [13], ale osteoklasty jsou mnohjaderné buňky vznikající z hematopoetických kmenových buněk mononukleární řady [11].

Mezi ukazatele charakterizující kostní obrát patří osteokalcin. Osteokalcin (OC) je nekolagenní protein syntetizovaný osteoblasty, osteocyty a odontoblasty. Osteokalcin se váže na hydroxyapatit kostní matrix, a proto může být uvolňován do cirkulace nejen během syntézy kosti, ale také během kostní resorpce [6]. Ukazatelem časně novotvorby kostní tkáně je aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (PINP). Kolagen typu I je syntetizován osteoblasty ve formě

prokolagenu, na který jsou napojeny telopeptidy a N-terminální (PINP) a C-terminální (PICP) propeptidy. Po vyloučení do mezibuněčného prostoru dojde k odštěpení propeptidů a jejich uvolnění do cirkulace. Koncentrace cirkulujícího PINP je tedy přímo úměrná množství nově vytvořeného kolagenu a množství nově mineralizované kostní matrix.

Kostní resorpce je často hodnocena pomocí karboxyterminálního telopeptidu kolagenu typu I (ICTP), který se odštěpuje z C-terminálního konce kolagenu [18]. Dalším biochemickým ukazatelem kostní resorpce je tartát rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP). Jedná se o enzym, který katalyzuje hydrolyzu monoesterů fosforečnanu při kyselém pH. Nachází se v buňkách osteoklast-makrofágové linie a na aktivní straně obsahuje dva železití ionty. Podle některých autorů aktivita TRACP charakterizuje počty a aktivitu osteoklastů [1].

Vzhledem k původu osteoklastů jsme předpokládali, že ovlivněním hematopoetických buněk opakovanými krevními odběry a se substitucí železa dojde k ovlivnění i osteoklastů a následně i osteoblastů. Cílem této studie bylo sledovat vliv opakovaných krevních odběrů a železa v dietě na kostní hmotu potkanů.

Materiál a metody

Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání LFUK-HK a je v souladu se správnou laboratorní praxí. Samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice) byli chováni v plastových klecích za standardních podmínek, přístup k potravě a vodě *ad libitum*. Potkani ve věku 8 týdnů s tělesnou hmotností 315 ± 7 g, byli rozděleni do 4 skupin po 6 zvířatech a po dobu 8 týdnů krmení standardní laboratorní dietou (SLD, VELAZ, a. s., Lysá nad Labem, 27 mg elementárního Fe/kg diety) nebo stejnou dietou obohacenou o železo (FE, 400 mg elementárního Fe/kg diety). Každý týden byl u pokusných skupin proveden odběr (w) 0,5 ml krve na 100 g tělesné hmotnosti z retroorbitálních sinusů v éterové narkóze, celkem 8krát. U kontrolních skupin byl proveden odběr krve pouze na konci pokusu, v 8. týdnu. Skupiny zvířat: SLD – kontrolní potkani krmení SLD dietou, bez odběrů krve; FE – kontrolní potkani krmení FE dietou, bez odběrů krve; SLD-w – potkani krmení SLD dietou, 8krát odběr krve; FE-w – potkani krmení FE dietou, 8krát odběr krve. Potkani byli na konci pokusu usmrceni odběrem krve z břišní aorty v éterové narkóze.

Table 1. Respiratory burst of whole blood phagocytes, hemoglobin, serum hepcidin and iron concentration, and liver iron concentration in 8th week

	SLD	FE	SLD-w	FE-w
Spontaneous burst (%)	1.70 (0.95–1.92) ^x	0.80 (0.73–1.02)	3.60 (2.15–5.25) ^x	2.95 (1.80–4.65)
Stimulated burst (%)	20.0 (11.1–20.0) ^{yy}	7.3 (5.4–7.4) ^{yy}	17.1 (11.9–22.4) ^y	30.3 (23.2–36.1) ^y
Serum prohepcidin (µg/l)	219 (212–237) ^{yyy}	201 (150–266) ^{yy}	188 (159–243) ^{yyy}	172 (154–213) ^{yy}
Hemoglobin (g/l)	157.8 ± 1.9	161.0 ± 1.2 [#]	151.0 ± 1.3	153.8 ± 2.4 [#]
Serum iron (µmol/l)	36.72 ± 1.73 ^a	37.28 ± 1.11	50.05 ± 9.78 ^a	41.04 ± 2.72
Iron in liver (µg/g)	787.1 ± 162.2	863.7 ± 118.3	550.8 ± 120.6	806.4 ± 60.6

SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, eight blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, eight blood withdrawals; 1 w: 1st blood withdrawal; 3 w: 3rd blood withdrawal; 8 w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: one symbol represents statistical significance $p < 0.05$, two symbols $p < 0.01$ and tree symbols $p < 0.001$.

V Osteologickém centru Fakultní nemocnice v Hradci Králové na přístroji Hologic Delphi A (Hologic, MA, USA) byla změřena kostní minerální hustota (BMD, g/cm²).

V plně heparinizované krvi byl stanoven krevní obraz (Abbott CELL-DYN 3200 SL, Abbott, IL, USA) a koncentrace hemoglobinu (g/l). Spontánní respiratorní vzplanutí polymorfonukleárů (RB) bylo stanoveno na Cytomics FC500 flow cytometer (488nm, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) dihydrorhodaminem 123 (DHR, Sigma, Praha, CZ) a stimulované RB prostřednictvím phorbol myristat acetátu (PMA, Sigma, Praha, CZ). Pozitivita byla hodnocena na florescenčním kanále (575 nm) a data byla hodnocena na CXP Analysis software.

V séru byla stanovena koncentrace železa (µmol/l) a koncentrace prohepcidinu (µg/l, Hepcidin prohormone EIA-4015, DRG, Germany). Obsah železa v játrech (µg/g suché tkáně) byl stanoven atomovou absorpční spektrofotometrií (Unicam, Solaar 959, UK) po vysušení (Milestone MLS 1200 MEGA, Italy).

Stav kostního metabolismu byl hodnocen ukazateli osteoformace a osteoresorpce s využitím kitů EIA firmy Nordic Bioscience Diagnostics (Rat-MIDTM Osteocalcin (µg/l), RatLapsTM (µg/l) a RatTRAPTM assay (U/l), dále Rat/Mouse PINP EIA (µg/l, Immunodiagnostic Systems Ltd).

Statistická analýza byla provedena programem SigmaStat 3.1 Jandel Scientific® (San Rafael, CA, USA) pomocí nepárového t-testu, případně Mannovým-Whitneovým testem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM) nebo jako medián a 25. a 75. percentil. Statistická významnost je značená pomocí symbolů, identické symboly popisují porovnávané skupiny.

Jeden symbol značí statistickou významnost $p < 0,05$, dva symboly značí $p < 0,01$ a tři symboly značí $p < 0,001$.

Výsledky

U skupin s krevními odběry v porovnání se skupinami bez odběrů došlo ke zvýšení spontánního RB, stimulované RB se zvýšilo pouze u skupiny FE-w ve srovnání s kontrolní FE skupinou. Koncentrace sérového prohepcidinu, hemoglobinu i železa v játrech poklesly u skupin s krevními odběry ve srovnání s potkany bez odběrů, naopak koncentrace železa v séru se významně zvýšila u SLD-w (tab. 1).

Koncentrace osteokalcinu se vlivem železa v prvním odběru zvýšila ve srovnání s kontrolní SLD skupinou, následně klesala a v osmém odběru klesla na hodnoty nižší než hodnoty kontrolní FE skupiny. U SLD-w zvířat byl průběh stejný, ale bez statistické významnosti. V jednotlivých odběrech nebyl mezi odběrovými skupinami významný rozdíl (graf 1).

Koncentrace PINP a CTx se u FE-w skupiny zvýšily v prvním týdnu, poté došlo k poklesu na hodnoty nižší než u kontrolní FE skupiny. U skupiny SLD-w došlo k největšímu nárůstu až ve třetím týdnu, poté došlo k poklesu na hladinu kontrolní skupiny SLD (graf 2 a 3).

Koncentrace TRAP se významně zvýšila u skupiny FE-w v prvním týdnu, u skupiny SLD-w byl nástup pomalejší s maximem v týdnu třetím, poté koncentrace poklesly na hodnoty kontrolních SLD a FE skupin (graf 4).

U potkanů s krevními odběry došlo k nárůstu kostní hustoty v bederním a ocasním obratli, zvláště u skupiny FE-w ve srovnání se kontrolní skupinou SLD. V oblasti femuru u FE-w hodnoty BMD nevýznamně poklesly (tab. 2).

Diskuse

Nejdříve bylo v experimentu nutné odhadnout, jestli má zvýšený obrat železa při opakovaných krevních odběrech vliv na organismus potkanů, a to jak při krmení standardní dietou, tak i dietou obohacenou o železo.

Z výsledků je zřejmé vyšší spontánní respirační vzplanutí krevních fagocytů u potkanů s opakovanými krevními odběry. Vyšší stimulované RB u skupiny FE-w, ve srovnání s potkany bez krevních odběrů, pravděpodobně vypovídá o vyšší aktivitě fagocytárních buněk imunitního systému. Domníváme se, že vyšší reaktivita u FE-w skupiny, ve srovnání se skupinou SLD-w, může souviset s dostatečnými zásobami železa v organismu. Z výsledků studie, ve které autoři sledovali vliv diety obohacené o železo na postmenopauzální potkany, vyplývá zapojení oxidačního stresu do patogeneze kostních nemocí, jako je osteoporóza [8]. V další práci autoři sledovali u dobrovolných dárců krve vliv železa jako prooxidačního faktoru na rozvoj aterosklerózy a pokles tohoto rizika opakovanými krevními odběry. Zjistili, že osm a více krevních odběrů během dvou let vede k poklesu zásob železa, poklesu oxidačního stresu a zlepšení stavu cév ve srovnání s dárci s maximálně dvěma odběry během dvou let [19].

Syntéza hemoglobinu je mimo jiné závislá na množství železa v organismu, tomu odpovídají nižší koncentrace hemoglobinu u skupin potkanů s odběry na konci pokusu, statisticky významně však pouze skupiny se suplementací železem. Podle některých autorů je však za spolehlivější ukazatel hodnocení zásob železa v organismu považována sérová hladina ferritinu [2] a zásobní železo v játrech [7].

Hepcidin je malý peptid tvořený 25 aminokyselinami s antimikrobiálními vlastnostmi, jeho hlavní syntéza probíhá v játrech, odkud je sekretován do krevního řečiště, a poté vylučován ledvinami. Hepcidin reguluje příjem železa vazbou na ferroportin, jediný známý transportér železa. Stimulace syntézy hepcidinu vede

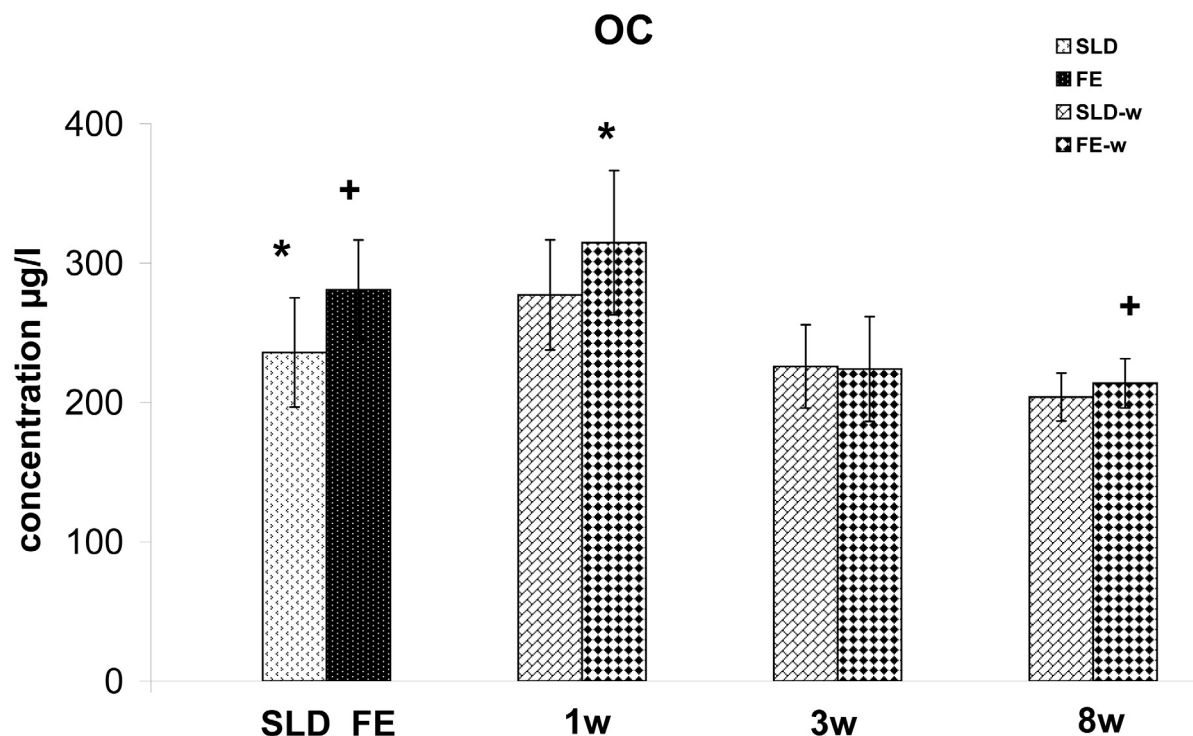


Fig. 1. Osteocalcin concentration

SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, eight blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, eight blood withdrawals; 1w: 1st blood withdrawal; 3w: 3rd blood withdrawal; 8w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: one symbol represents statistical significance $p < 0.05$.

k potlačení absorpce železa ze střeva a jeho uvolňování z enterocytů a makrofágů [3]. Expres hepcidinu klesá s nedostatkem železa a stimulací erythropoézy a stoupá

s nadbytkem železa nebo zánětem [5]. Patologické stavy (mutace genů, chronické záněty), kdy dochází k rychlejší maturaci prohepcidinu na hepcidin [14], jsou

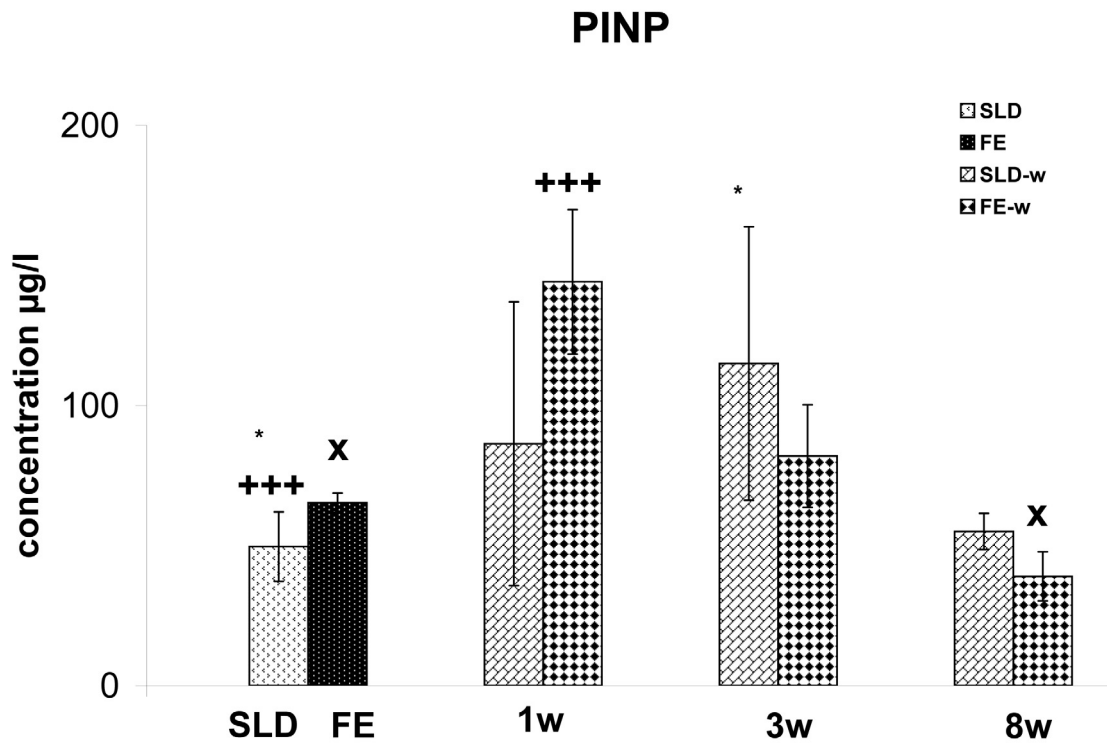


Fig. 2. N-terminal propeptid of procollagen I (PINP) concentration

SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, eight blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, eight blood withdrawals; 1w: 1st blood withdrawal; 3w: 3rd blood withdrawal; 8w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: one symbol represents statistical significance $p < 0.05$ and tree symbols $p < 0.001$.

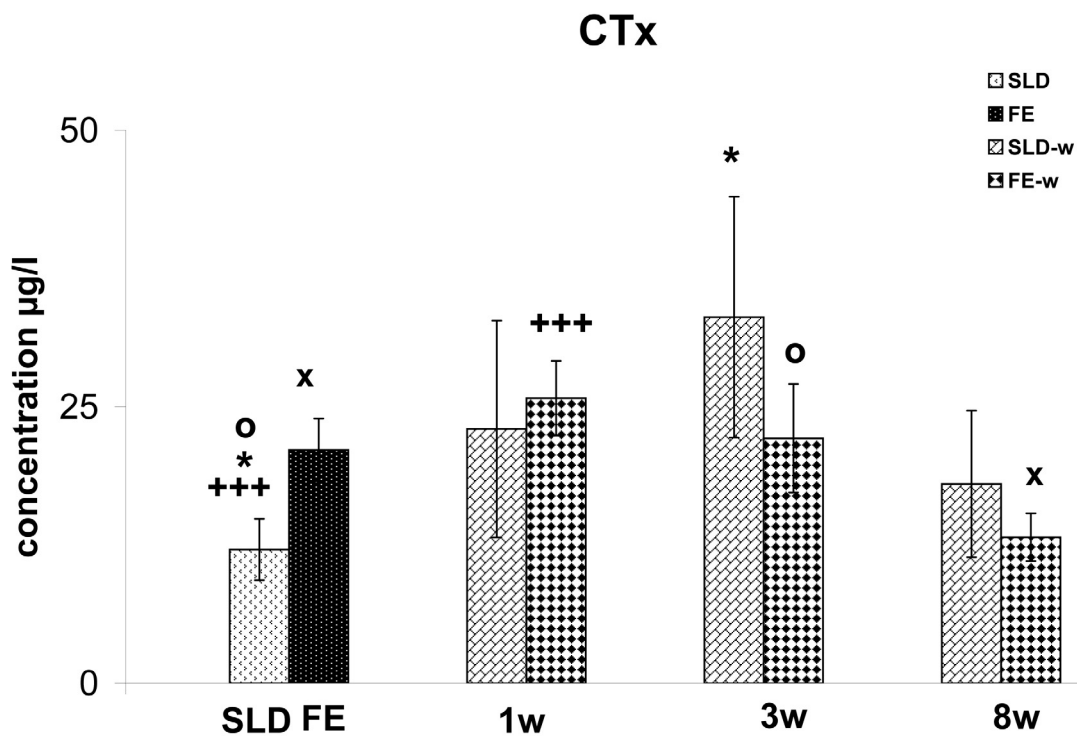


Fig. 3. C-terminal telopeptid of collagen I (CTx) concentration

SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, eight blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, eight blood withdrawals; 1w: 1st blood withdrawal; 3w: 3rd blood withdrawal; 8w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: one symbol represents statistical significance $p < 0.05$ and tree symbols $p < 0.001$.

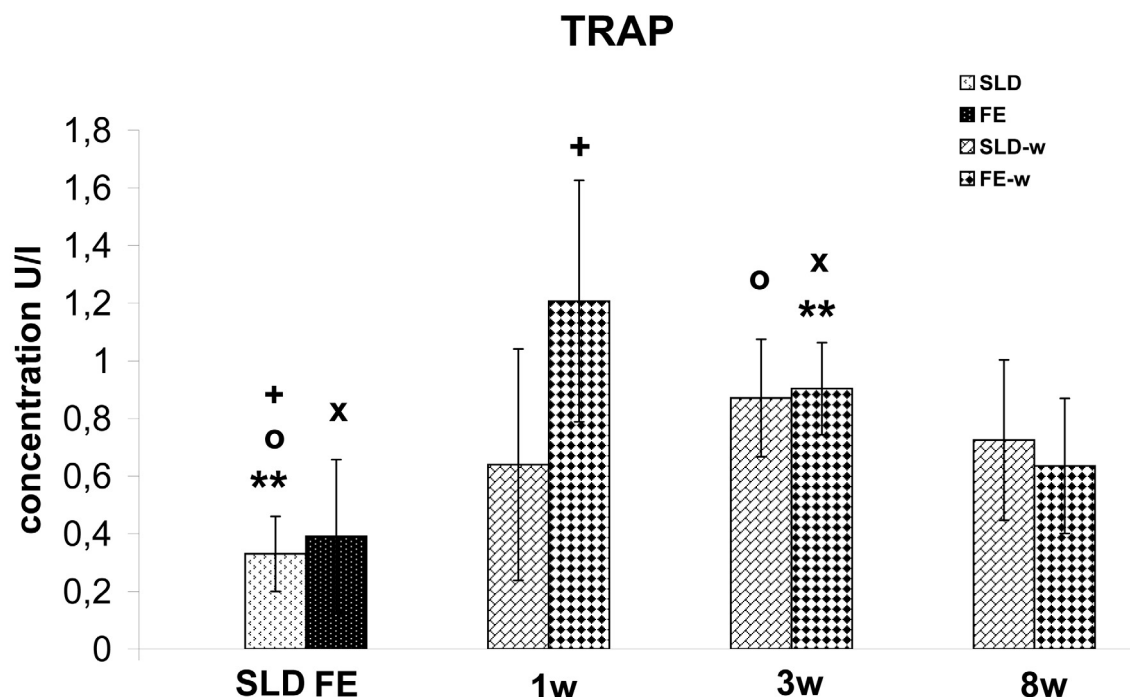


Fig. 4. Tartat resistant acid phosphatase (TRAP) concentration

SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, eight blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, eight blood withdrawals; 1w: 1st blood withdrawal; 3w: 3rd blood withdrawal; 8w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: one symbol represents statistical significance $p < 0.05$ and two symbols $p < 0.01$.

Table 2. BMD (g/cm²)

	SLD	FE	SLD-w	FE-w
R1	0.217 ± 0.004 ⁺	0.222 ± 0.003	0.227 ± 0.006	0.230 ± 0.005 ⁺
R2	0.210 ± 0.008 ⁺⁺	0.217 ± 0.007	0.222 ± 0.005	0.234 ± 0.004 ⁺⁺
R3	0.181 ± 0.009	0.185 ± 0.015	0.181 ± 0.012	0.176 ± 0.007

R1 = spine; R2 = tail; R3 = femur, SLD – fed by SLD diet and without blood withdrawals; FE – fed by SLD diet and without blood withdrawals; SLD-w – fed by SLD diet, nine blood withdrawals; FE-w – fed by diet enriched of iron, nine blood withdrawals; 1w: 1st blood withdrawal; 3w: 3rd blood withdrawal; 8w: 8th blood withdrawal. The identical symbols indicate compared groups: two symbols represents statistical significance $p < 0.01$.

spojeny s akumulací železa a jaterním poškozením [4]. Domníváme se, že námi zjištěné nižší koncentrace prohepcidinu u pokusných skupin byly důsledkem zvýšeného obratu železa po krevních odběrech, kdy organismus byl spíše ohrožen nedostatkem železa než jeho nadbytkem.

U potkanů SLD-w, kteří mají nejnížší zásoby železa v játrech, v hlavním zásobním orgánu [7], paradoxně nacházíme vyšší koncentrace železa v séru. Předpokládáme, že u této skupiny s nejnížšími zásobami železa v játrech, je i snižená aktivita fagocytů, maskovaná stimulačním vlivem krevních odběrů.

Opakované krevní odběry zvýšily reaktivitu buněk makrofágového systému u skupiny suplementované železem. Domníváme se, že vyšší aktivita fagocytů prokázaná v krvi by se mohla odrážet také v kostním metabolismu, z důvodu společného původu osteoklastů a makrofágů.

Železo se účastní tvorby kostí na mnoha úrovních. Je součástí 25-hydroxyvitamin D hydroxylázy potřebné

k přeměně vitamínu D na aktivní formu, která se účastní tvorby osteokalcinu [16]. Železo je také kofaktorem prolylhydroxylázy, enzymu účastnícího se syntézy kolagenu [17]. Proto se může při nedostatku železa snížit aktivita těchto na železu závislých enzymů [10].

Ve srovnání se skupinou FE-w byl u skupiny SLD-w nárůst koncentrací TRAP, PINP i CTx opožděn. Předpokládáme, že u této skupiny s relativním nedostatkem železa v organismu je pomaleji aktivována osa osteoklast-osteoblast.

U skupiny FE-w došlo již po týdenním podávání diety obohacené o železo k významnému nárůstu všech stanovených kostních ukazatelů, především významně vzrostly koncentrace PINP a TRAP provázené též nárůstem koncentrací OC a CTx. Tyto změny se v dalším průběhu pokusu dále neprokázaly. Jeví se nám, že ukazatele kostního obratu odrážejí významně akutní vlivy, a to lépe než vlivy dlouhodobé (odběry krve). Domníváme se, že vyšší reaktivita buněk makrofágového systému vedla ke zvýšení aktivity osteoklastů

v kostní matrix s nastartováním novotvorby kostí, která v pozdějších intervalech převážila nad osteoresorpcí. Celý tento proces aktivace se na konci pokusu promítl do významného nárůstu kostní minerální hustoty (BMD) v lumbální části páteře a proximální části ocasu u FE-w skupiny. Tento nárůst pravděpodobně souvisí s převahou metabolicky aktivnější trabekulární kosti v obratlech s aktivní kostní dřevinou, ve srovnání s femurem, kde převažuje kost kortikální.

Z prvních pilotních výsledků se domníváme, že stimulace krvetvorby opakovanými krevními odběry má pozitivní vliv na kvalitu kostní tkáně. V dalších studiích bude nezbytné se více věnovat této otázce, neboť by mohla mít klinicky významný dopad především pro dobrovolné dárce krve.

Literatura

1. **Alatalo, S. L., Ivaska, K. K., Waguespack, S. G., Econs, M. J., Väänänen, H. K., Halleen, J. M.** Osteoclast derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis (ADO2)). *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 883–90.
2. **Cançado, R. D., Chiattonne, C. S., Alonso, F. F., Langhi, D. M. Jr., Alves R.** Iron deficiency in blood donors. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med*, 2001, 119 (4), p. 132–134.
3. **Deicher, R., Hörl, W. H.** New insights into the regulation of iron homeostasis. *European Journal of Clinical Investigation*, 2006, 36, p. 301–309.
4. **Fink, S., Schilsky, M. L.** Inherited metabolic disease of the liver. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2007, May 23 (3), p. 237–243.
5. **Ganz, T., Nemeth, E.** Iron imports: IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2006, 290, p. 199–203.
6. **Gundberg, C. M., Grant, F. D., Conlin, P. R. et al.** Acute changes in serum osteocalcin during induced hypocalcemia in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1991, 72 (2), p. 438–443.
7. **Horiguchi, H., Oguma, E., Kayama, F.** The effects of iron deficiency on estradiol-induced suppression of erythropoietin induction in rats: implications of pregnancy-related anemia. *Blood*, 2005, 106, p. 67–74.
8. **Isomura, H., Fujie, K., Shibata, K. et al.** Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, 2004, 197, p. 93–100.
9. **Javadzadeh, S. H., Attar, M., Taher, Y. M.** A study of the prevalence of iron deficiency and its related factors in blood donors of Yazd, Iran, 2003. *Transfus. Med.*, 2005, 15 (4), p. 287–293.
10. **Katsumata, S., Tsuboi, R., Uehara, M., Suzuki, K.** Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70 (10), p. 2547–2550.
11. **Kurihara, N., Chenu, C., Miller, M., Civin, C., Roodman, G. D.** Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology*, 1990, 126, p. 2733–2741.
12. **Maghsudlu, M., Nasizadeh, S., Toogeh, G. R., Zandieh, T., Parandoush, S., Rezayani, M.** Short-term ferrous sulfate supplementation in female blood donors. *Transfusion*, June 2008, 48, p. 1192–1197.
13. **Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A. K., Aubin, J. E.** Cellular expression of bonerelated proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J. Cell. Physiol.*, 1994, 158, p. 555–572.
14. **Pandur, E., Nagy, J., Poór, V. S. et al.** Alpha-1 antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum. *FEBS J.*, 2009, 276 (7), p. 2012–2021.
15. **Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C. L.** *The Laboratory Rat*. (Second edition), San Diego: Elsevier Academic Press 2006, 912 p., ISBN 0-12-074903-3.
16. **Theofan, G., Price, P. A.** Bone Gla protein messenger ribonucleic acid is regulated by both 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in rat osteosarcoma cells. *Mol. Endocrinol.*, 1989, 3 (1), p. 36–43.
17. **Tuderman, L., Myllyla, R., Kivirikko, K. I.** Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction I, role of co-substrates. *Eur. J. Biochem.*, 1977, 80, p. 341–348.
18. **Ureña, P., Vernejoul, M. CH.** Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney International*, 1999; 55, p. 2141–2156.
19. **Zheng, H., Cable, R., Spencer, B., Votto, N., Katz, S. D.** Iron Stores and Vascular Function in Voluntary Blood Donors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25, p. 1577–1583.

Podpořeno Výzkumným záměrem MZO 00179906.

Do redakce došlo 18. 2. 2009.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Klára Švejkovská

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN

Vivárium a radioizotopové laboratoře

Šimkova 870

500 38 Hradec Králové

e-mail: svejkovskak@lfhk.cuni.cz