

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ANA JEGLIČ (MRAMOR)

MAGISTRSKA NALOGA

**MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA JEGLIČ (MRAMOR)

OCENA DOLOČITVE KONCENTRACIJE HEPCIDINA V
SERUMU BOLNIKOV Z ANEMIJO

ASSESSMENT OF THE DETERMINATION OF HEPCIDIN
CONCENTRATION IN SERUM OF ANEMIC PATIENT

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med., in somentorstvom asist. dr. Tadeja Pajiča, univ. dipl. inž., spec. med. biokem.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Černelču, dr. med., ter somentorju asist. dr. Tadeju Pajiču, univ. dipl. ing. kem., spec. med. biokem., za vodenje, strokovno pomoč in svetovanje pri izdelovanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi Meliti Žakelj, Valeriji Bogovčič, Slavici Markač, Martini Fink, Evi Jarc in ostalim sodelavcem za pomoč pri organizaciji in izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Kliničnemu inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Hematološki ambulanti, Hematološkemu oddelku in Kliničnemu oddelku za nefrologijo ter Oddelku za dializo za dobro sodelovanje in pomoč pri raziskavi.

Posebna zahvala pa gre mojim najdražjim, posebej Boštjanu in Žigu, za podporo in potrpljenje ter staršema in sestrama za usmerjanje in podporo v vseh letih šolanja. Zahvaljujem se tudi Darji, Janji in Jasmini za neskončno število ur, ko so čuvale malega Žiga.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med., in somentorstvom asist. dr. Tadeja Pajiča, univ. dipl. ing. kem., spec. med. biokem.

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

Ljubljana, 2014

Ana Jeglič

VSEBINA

1	BOLEZNI CELIC ERITROCITNE VRSTE	1
1.1	RAZVRSTITEV ANEMIJ	1
1.2	ANEMIJE ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA.....	3
1.2.1	Klinična slika.....	4
1.2.2	Diagnoza	5
1.2.3	Zdravljenje	6
1.3	PRESNOVA ŽELEZA.....	6
1.3.1	Izgube železa	7
1.3.2	Absorpcija železa v prebavilih	7
1.3.3	Transport železa	8
1.3.4	Zaloge železa.....	9
1.3.5	Kroženje železa	9
1.4	HEPCIDIN	10
1.4.1	<i>Uravnavanje hepcidina</i>	11
1.4.1.1	Uravnavanje koncentracije hepcidina v telesu z železom	12
1.4.1.2	Uravnavanje hepcidina z eritropoezo	13
1.4.1.3	Vnetje	13
1.4.1.4	Hipoksija.....	14
1.4.1.5	Endokrino uravnavanje.....	14
1.4.1.6	Izguba hepcidina prek ledvic	14
1.4.2	Bolezenska stanja, povezana s povečano koncentracijo hepcidina ali pomanjkanjem feroportina	15
1.4.2.1	Anemija zaradi pomanjkanja železa	15
1.4.2.2	Refraktarna anemija s pomanjkanjem železa	15
1.4.2.3	Anemija zaradi kroničnih bolezni in vnetij	15
1.4.2.4	Anemija pri kronični ledvični bolezni	15
1.4.3	Bolezenska stanja, povezana s pomanjkanjem hepcidina ali rezistenco na njegovo delovanje	15
1.4.3.1	Dedna hemokromatoza (DH).....	15
1.4.3.2	Anemija z odlaganjem železa	16
1.4.4	Diagnostične in terapevtske možnosti hepcidina	16

1.4.4.1	Določanje hepcidina v krvi in drugih telesnih tekočinah	16
1.4.4.2	Možnosti zdravljenja z uravnavanjem ravni hepcidina	17
2	NAMEN IN HIPOTEZE	19
3	VZORCI IN METODE	21
3.1	PREISKOVANCI	21
3.2	ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV	22
3.3	METODE DELA	22
3.3.1	Določitev hematoloških in biokemičnih preiskav krvi ter referenčne vrednosti.....	22
3.3.2	Določitev koncentracije hepcidina v serumu	25
3.3.2.1	Priprava in obstojnost reagentov, standardov ter kontrol in vzorcev	25
3.3.2.2	Priprava vzorcev za določitev območja linearnosti metode	26
3.3.2.3	Priprava vzorcev za določitev natančnosti metode	26
3.3.3	Instrumenti in oprema	27
3.3.4	Delovni postopek.....	27
3.6	STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	DOLOČITEV REFERENČNIH VREDNOSTI.....	31
4.2	DOLOČITEV OBMOČJA LINEARNOSTI ANALIZNE METODE.....	35
4.3	DOLOČANJE NATANČNOSTI ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE HEPCIDINA V SERUMU	37
4.3.1	Določanje ponovljivosti metode v seriji.....	37
4.3.2	Določanje ponovljivosti metode med serijami	38
4.4	Rezultati koncentracije hepcidina v serumu pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa	40
4.5	Rezultati koncentracije hepcidina bolnikov s kronično ledvično boleznijo	41
4.6	Povezanost (korelacija) koncentracije hepcidina s parametri za oceno stanja zalog železa in učinkovite eritropoeze	42
4.7	Razlike v koncentraciji hepcidina glede na parametre	44
4.8	Primerjava koncentracije hepcidina med zdravimi, bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolniki z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni.....	45
5	RAZPRAVA	46
6	SKLEPI	50
7	LITERATURA.....	51

POVZETEK

Hepcidin je peptidni hormon, ki uravnava homeostazo železa v organizmu. Izločajo ga hepatociti in zavira tako absorpcijo železa iz prebavil kot njegovo sproščanje iz makrofagov. Sintezo hepcidina spodbujajo povečane zaloge železa v telesu in vnetje, znižujejo pa anemija in hipoksija.

V okviru magistrske naloge smo v rutinsko prakso uvedli analizno metodo za določanje koncentracije hepcidina v serumu z imunskim načinom na mikrotitrskih ploščah (ELISA).

Analizno metodo za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo delno validirali. Metodi smo določili natančnost in območje linearnosti. Linearnost smo določili od najvišje koncentracije 13,14 nmol/L do 0,42 nmol/L. Test linearnosti je pokazal dobro ujemanje med izmerjenimi in dejanskimi vrednostmi. Determinacijski koeficient (R^2) je znašal 0,9839. Pri majhnih koncentracijah hepcidina, pod 0,80 nmol/L, pa je bilo ujemanje med pričakovano in dejansko vrednostjo slabše. Odstopanje med njima pri dveh testnih vzorcih je bilo večje od 30 odstotkov. To je bila naša meja sprejemljivosti rezultatov linearnosti.

Določili smo tudi natančnost metode "v seriji" (within-run) in "med serijami" (between-run). Vrednost koeficienta variacije (CV%) pri določitvi ponovljivosti metode določanja koncentracije hepcidina "v seriji" znaša 3,24 odstotka, kar je primerljivo s podatki proizvajalca (CV% v seriji 5,1 odstotka).

Povprečna vrednost koeficienta variacije pri ponovljivosti "med serijami" znaša 3,15 odstotka, po podatkih proizvajalca pa so te vrednosti višje (CV% med serijami 12,7 odstotka).

Za izračun referenčnih vrednosti smo uporabili vrednosti koncentracije hepcidina v serumu 56 zdravih preiskovancev ter dobili referenčne vrednosti hepcidina **(1,34 do 11,20) nmol/L**.

Preverili smo, ali prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina med zdravimi preiskovanci, bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa in med bolniki z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni. Dokazali smo, da med vsemi tremi skupinami prihaja do statistično pomembnih razlik, kar smo tudi pričakovali. Bolniki s kroničnimi ledvičnimi boleznimi imajo mediano koncentracije hepcidina veliko ($Me = 26,46$ nmol/L)

nad zgornjo referenčno mejo. Bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa imajo serumske koncentracije hepcidina zmanjšane ($Me = 1,26$), kar je pod referenčnim območjem.

Do statistično pomembnih razlik prihaja v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo koncentracijo feritina v serumu pod 200, v primerjavi s tistimi, ki ga imajo nad $200\mu\text{g/L}$ ($P = 0,006$; Mann-Whitney test).

SEZNAM OKRAJŠAV

AKL – anemija pri kronični ledvični bolezni

AKV – anemija zaradi kroničnih bolezni in vnetij

APŽ – anemija zaradi pomanjkanja železa

BMP6 – proteini uravnavanja tvorjenja kostnine (bone morphogenic proteins)

CRP – C reaktivni protein

DcytB – dudenalna citokrom b reduktaza

DH – dedna hemokromatoza

DMT1 – železov divalentni transporter 1 (divalent metal transporter 1)

ELISA – encimsko imunski test na trdnih nosilcih (enzyme linked immuno sorbent assay)

EPO – eritropoetin

FNP – feroportin 1

Hb – koncentracija hemoglobina

HEPC – hepcidin

Hipo Erci – delež hipokromnih eritrocitov

HJV – hemojuvelin

HO-1 – hem oksigenaza-1

IL-6 – interlevkin-6

K₃EDTA – trikalijeva sol etilendiamintetraocetne kisline

KVVE – koeficient variacije volumna eritrocitov

mRNA – sporočilna ribonukleinska kislina (messenger ribonucleid acid)

PHE – povprečna količina hemoglobina v eritrocitih

PKHE – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih

PVE – povprečni volumen eritrocitov

RAPŽ – refraktarna anemija s pomanjkanjem železa

SMAD – skupina intracelularnih proteinov, ki pretvarjajo signale v celici in tako vplivajo na transkripcijo genov

STAT-3 – pretvornik signala in aktivator transkriptaze-3 (Signal transducer and activator of transcription-3)

sTfR – topni transferinski receptor (soluble transferrin receptor)

Tf – transferin

TfR1 – transferinski receptor R1

TfR2 – transferinski receptor R2

TIBC – celotna vezalna sposobnost seruma za železo (total iron binding capacity)

TMPRSS5 – transmembranska proteaza serin 5 (transmembrane protease, serine 5)

UIBC – prosta vezalna sposobnost seruma za železo (unsaturated iron binding capacity)

2,3-DPG – 2,3-difosfoglicerat

SEZNAM SLIK

Slika 1: Absorpcija železa v enterocitu

Slika 2: Uravnavanje železa s hepcidinom

Slika 3: Uravnavanje sinteze hepcidina

Slika 4: Uravnavanje hepcidina z BMP-HJV-SMAD in IL-6-STAT3

Slika 5: Serijska redčitev vzorcev za določitev linearnosti metode

Slika 6: Princip določanja koncentracije hepcidina

Slika 7: Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo

Slika 8: Mikrotitrsko plošča

Slika 9: Čitalec mikrotitrskih plošč AD 340 Beckman Coulter

Slika 10: Grafična primerjava koncentracije hepcidina po spolu zdravih preiskovancev

Slika 11: Ujemanje izmerjenih vrednosti z dejanskimi

Slika 12: Linearen model določanja linearnosti brez omenjenih 3 vrednosti

Slika 13: Grafična primerjava koncentracije hepcidina pri bolnikih, ki imajo koncentracijo feritina nad 200 μ g/L, s tistimi, ki imajo koncentracijo feritina pod 200 μ g/L

Slika 14: Grafična primerjava koncentracije hepcidina pri bolnikih, ki imajo 1 – anemijo zaradi pomanjkanja železa, 2 – anemijo zaradi kronične ledvične bolezni in 3 – zdravi preiskovanci.

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Referenčne vrednosti preiskav krvne slike ter biokemičnih parametrov, ki smo jih uporabili pri preiskavi

Preglednica II: Skupna opisna statistika (moški in ženske) nekaterih parametrov krvne slike

Preglednica III: Opisna statistika nekaterih parametrov krvne slike 29 zdravih žensk

Preglednica IV: Opisna statistika nekaterih parametrov krvne slike 27 zdravih moških

Preglednica V: Koncentracije hepcidina v serumu zdravih preiskovancev

Preglednica VI: Koncentracije hepcidina 3 različnih vzorcev za določitev linearnosti metode

Preglednica VII: Določitev ponovljivosti določanja koncentracije hepcidina v seriji meritev

Preglednica VIII: Koncentracije hepcidina štirih različnih vzorcev, ki so bili narejeni v triplikatu v treh dneh

Preglednica IX: Srednja vrednost (X), standardni odklon (SD), minimalna (min) in maksimalna vrednost (max), mediana (Me) ter 1. in 3. kvartil za starost ter parametre iz diferencialne krvne slike pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Preglednica X: Opisna statistika števila retikulocitov (ret), vrednosti hemoglobina v retikulocitih (Ret hem), delež hipokromnih eritrocitov (Hipo erci), Fe, UIBC, TIBC, sTrR, FER, sTrR, CRP ter HEPC in EPO pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Preglednica XI: Opisna statistika za starost ter parametre iz diferencialne krvne slike pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo

Preglednica XII: Opisna statistika za Hypo Erci, Ret Hb, Fe³⁺, UIBC, TIBC, Sat Tf, FER, HEPC, EPO ter sTrR pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo

Preglednica XIII: Korelacija HEPC s fer, EPO, Hct, Hb, Hypo Erci, PHE, PVE in KVVE

Preglednica XIV: Korelacija HEPC z Ret, Ret Hb, Sat Tf, TIBC, UIBC Fe in feritinskim indeksom (Fer indeks)

1 BOLEZNI CELIC ERITROCITNE VRSTE

Anemijo lahko opredelimo kot stanje, ko je celotna masa eritrocitov v krvnem obtoku zmanjšana. Težave, ki jih povzroča anemija, so posledica zmanjšane sposobnosti krvi za prenos kisika. V klinični hematologiji govorimo o anemiji, kadar je koncentracija hemoglobina v krvi pod referenčno vrednostjo. Pri tem moramo upoštevati stanja, kjer koncentracija hemoglobina ne odraža dejanskih sprememb celotne količine hemoglobina oz. eritrocitov. Tako stanje najdemo pri anemiji po akutni krvavitvi ali pri spremembah volumna plazme, ki so povezana s spremembo količine eritrocitov, npr. hiperhidracija ali dehidracija. Kot spodnjo referenčno vrednost koncentracije hemoglobina priporočajo za moške 140 g/L in za ženske 120 g/L (1).

Na anemijo se telo prilagodi s povečanjem minutnega volumna srca in redistribucijo obtoka v organe, ki potrebujejo več kisika, npr. v možgane.

Drugi način prilagoditve na anemijo je povečanje koncentracije 2,3-difosfoglicerata (2,3-DPG) v eritrocitih, kar povzroči premik disociacijske krivulje oksihemoglobina v desno. Zaradi zmanjšane afinitete za kisik se lahko le-ta v tkivih sprošča v večji meri.

Anemija je lahko samostojna bolezen, idiopatska ali primarna. Pogosteje je posledica drugih bolezni, simptomatska ali sekundarna (1).

1.1 RAZVRSTITEV ANEMIJ

Anemije razvrstimo po vzrokih oziroma po načinu nastanka (etiopatogeneza) ali na osnovi povprečnega volumna eritrocitov (PVE; morfološka razvrstitev) (1).

Po načinu nastanka razlikujemo:

- anemije zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov,
- anemije zaradi čezmernega razpada eritrocitov (hemolitične anemije),
- anemije po akutni krvavitvi.

Morfološka razvrstitev temelji na osnovi PVE. Tako razvrstimo anemije v mikrocitne, makrocitne in normocitne.

Glede na **koncentracijo hemoglobina (Hb)** v krvi lahko anemijo razvrstimo kot:

- blago (Hb > 100 g/L),
- srednje hudo (Hb 100–70 g/L),
- hudo (Hb < 70 g/L).

Glede **na trajanje** ločimo akutno in kronično anemijo.

Anemije zaradi zmanjšane tvorbe ločimo na normocitne, mikrocitne in makrocitne. Vzroki normocitnih anemij so lahko:

- aplastična anemija,
- mieloftizična anemija,
- bolezni endokrinih žlez,
- kronično ledvično popuščanje,
- kronične jetrne bolezni,
- kronično vnetje.

Mikrocitno anemijo najdemo pri anemiji zaradi pomanjkanja železa, sideroblastni anemiji in pri sindromih talasemij.

Pri megaloblastni in nemegaloblastni anemiji pa najdemo makrocitno anemijo.

Drugi razred so anemije zaradi zvečane razgradnje ali zvečane izgube, kamor spadajo korpuskularne hemolitične anemije, ekstrakorpuskularne hemolitične anemije ter anemije zaradi obsežnih krvavitev.

○ KORPUSKULARNE HEMOLITIČNE ANEMIJE (HA):

- paroksizmalna nočna hemoglobinurija,
- dedna sferocitoza,
- dedna eliptocitoza,
- hemoglobinopatije,
- encimopatije.

○ EKSTRAKORPUSKULARNE HA:

- imunske in avtoimunske,

- zaradi mehanične okvare,
- zaradi drugih vzrokov.
- KRVAVITEV

Anemije zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov razlikujemo od hemolitičnih anemij in anemij po krvavitvi, na osnovi tvorbe eritrocitov. Obseg nastajanja eritrocitov (učinkovito eritropoezo) ocenimo iz števila retikulocitov v krvi. Na anemijo zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov pomislimo, če je število retikulocitov v krvi manjše od $100 \times 10^9 / L$ (1)

Razlikujemo dve vrsti anemij zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov: hipoproliferativne anemije in anemije zaradi motnje v dozorevanju.

Pri anemiji zaradi krvavitve ali hemolitični anemiji se kot odgovor na anemijo dva- ali večkrat poveča tvorba eritrocitov. V kostnem mozgu se zaradi razrasti celic rdeče vrste spremeni razmerje med celicami granulocitne vrste in eritroblasti, in sicer v korist slednjih. Temu ustrezno je povečano tudi število retikulocitov v krvi (1).

1.2 ANEMIJE ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA

Anemija zaradi pomanjkanja železa je skoraj vedno mikrocitna in hipokromna in je najpogostejša anemija. Pogosta je pri mladih do pubertete in pri ženskah v rodni dobi. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je pomanjkanje železa prisotno pri 30 odstotkih ljudi, pri 43 odstotkih predšolskih otrok in pri 51 odstotkih nosečnic. Anemijo zaradi pomanjkanja železa najdemo pri 20 odstotkih žensk v rodni dobi, pri odraslih moških pa le 2 odstotka (1).

Pomanjkanje železa in anemija se razvijeta postopno. Najprej se porabi uskladiščeno železo. V makrofagih kostnega mozga ne najdemo feritina in hemosiderina, koncentracija železa v serumu je še normalna, ni anemije, zmanjšana je koncentracija serumskega feritina ($< 10 \mu\text{g/L}$). V naslednjem obdobju se zmanjšata koncentracija železa v serumu in zasičenost transferina z železom ter poviša se koncentracija serumskega transferinskega receptorja in protoporfirina. Povprečni volumen eritrocitov (PVE) in povprečna količina hemoglobina v eritrocitu (PHE) sta v tej fazi lahko še v referenčnem območju. Če se negativna bilanca železa nadaljuje, se razvije anemija. Eritrociti postanejo mikrocitni in

hipokromni, izrazitejša postane tudi poikilocitoza (različne oblike eritrocitov). PVE in PHE se zmanjšata. Serumski TIBC raste in železo pada.

Vzroki za anemijo zaradi pomanjkanja železa:

- kronična krvavitev v:
 - prebavila,
 - rodila (metroragija in menoragija),
 - sečila (hematurija),
 - dihala (epistakse, hemoptize),
 - hemoglobinurija in hemosiderinurija,

- povečana potreba po železu:
 - nosečnost,
 - obdobje rasti,
 - policitemija in poliglobulija,

- pomankljiva absorpcija iz hrane:
 - delna ali popolna resekcija želodca,
 - glutenska enteropatija,

- neustrezna prehrana (1).

Pri odraslih je kronična krvavitev najpogostejši vzrok za pomanjkanje železa. Pri ženskah v rodni dobi sta pogosta vzroka krvavitve menoragija in metroragija, ki nastaneta zaradi funkcionalnih motenj ter benignih in malignih tumorjev maternice.

Pomanjkljiva absorpcija železa iz hrane je redko edini vzrok pomanjkanja železa. Pri delni ali popolni resekciji želodca je absorpcija zmanjšana zaradi pospešenega prehoda hrane skozi dvanajsternik. Absorpcija železa je motena tudi pri glutenski enteropatiji (1).

1.2.1 Klinična slika

Simptomi in znaki so posledica osnovnega obolenja, ki je pripeljalo do pomanjkanja železa, anemije in motenj v delovanju tkiv, zaradi zmanjšane aktivnosti encimov, ki vsebujejo železo. Bolniki dolgo nimajo težav. Splošni simptomi anemije so slabost, utrujenost, težka sapa pri naporih, hitro utripanje srca. Ugotavljamo spremembe v

obnašanju, glavobol, razdražljivost, parestezija. Pojavijo se simptomi v prebavilih, kot so izguba teka, slabost in zaprtje.

S pregledom lahko ugotovimo bledico kože in sluznic, pospešen utrip srca.

1.2.2 Diagnoza

Poleg ugotovitve pomanjkanja železa moramo odkriti tudi vzrok zanj: krvavitev, motena absorpcija železa ali zvečana potreba po železu.

Anemija zaradi pomanjkanja železa je hipokromna in mikrocitna, v razmazu periferne krvi so poikilociti. Hipokromni eritrociti so slabše obarvani. Število trombocitov je normalno ali zvečano, število levkocitov je po navadi normalno.

Ključni preiskavi za ugotavljanje pomanjkanja železa sta koncentracija feritina v serumu in zasičenost transferina z železom. S koncentracijo feritina ocenimo zaloge železa v telesu, z zasičenostjo transferina pa razpoložljivost železa za eritropoezo. Če so zaloge železa zmanjšane ali izpraznjene, je koncentracija feritina v serumu pod 10 µg/L.

Koncentracijo transferina navadno merimo posredno z merjenjem celotne vezalne sposobnosti za železo (TIBC = total iron binding capacity). Zasičenost transferina z železom (satTf) izračunamo iz koncentracije serumskega železa in TIBC ($\text{Fe} \times 100 / \text{TIBC}$). Če je poševnica znak za deljeno, potem je potreben presledek na obeh straneh. Razpoložljivost železa za eritropoezo je zmanjšana, če je zasičenost transferina manjša od 15 odstotkov (1).

Transferin ima molekulsko maso 80 000. Je plazemski glikoprotein, ki se tvori predvsem v jetrih, nekaj malega tudi v možganih in testisih. Transferin je glavni plazemski prenašalec železa in ključen za sistemsko cirkulacijo železa. Veže dva atoma železa Fe^{3+} .

Za oceno razpoložljivosti železa za eritropoezo se uporablja tudi delež hipokromnih eritrocitov v krvi ali določitev količine hemoglobina v retikulocitih, predvsem pri ledvičnih bolnikih na dializah, ki dobivajo eritropoetin. Pri teh bolnikih je delež hipokromnih eritrocitov (Hipo Erci) tja do 6 odstotkov. Koncentracija hemoglobina v retikulocitih pod 32 pg je pri dializnih bolnikih kazalec pomanjkanja železa za eritropoezo. Koncentracija hemoglobina v retikulocitih nam tudi napove, kakšen bo odziv na zdravljenje anemije z železom, saj že po nekaj dneh zdravljenja zaznamo povečanje koncentracije hemoglobina v retikulocitih (17).

Tudi pri vnetjih je ocena zalog železa nezanesljiva, saj vnetje poveča koncentracijo feritina v krvi. Takrat določimo koncentracijo topnih transferinskih receptorjev (sTfR), saj vnetje nanje ne vpliva. Količnik med koncentracijo topnih transferinskih receptorjev (mg/L) in logaritmom koncentracije feritina ($\mu\text{g/L}$) v serumu (indeks feritina) je kazalec, ki odraža preskrbo eritropoeze z železom (15). Diagnostični diagram, ki povezuje rezultat vsebnosti hemoglobina v retikulocitih in indeksa feritina, se lahko uporabi za razlikovanje anemije zaradi pomanjkanja železa od anemije zaradi kroničnih bolezni in kombinirane anemije. Ta kombinacija povezuje biokemična pokazatelja preskrbe eritropoeze z železom v indeksu feritina s pokazateljem potreb po železu in vsebnostjo hemoglobina v retikulocitih (16). V epidemioloških raziskavah se kot presejalna preiskava za ugotavljanje pomanjkanje železa pogosto uporablja določanje prostega protoporfirina v eritrocitih. Koncentracija prostega protoporfirina v eritrocitih se pri pomanjkanju železa poveča (1).

1.2.3 Zdravljenje

Pri anemiji zaradi pomanjkanja železa razlikujemo anemije in zdravljenje njenega vzroka. Anemije zdravimo s pripravki železa peroralno, redkeje parenteralno. Uporabljamo pripravke dvovalentnega železa, npr. ferosulfat, feroglukonat, ferolaktat, feroglicinsulfat, ali pripravke trivalentnega železa, kjer je železo vezano v poseben kompleks, da se lahko absorbira.

Parenteralne pripravke železa dajemo v žilo (1).

1.3 PRESNOVA ŽELEZA

Železo je sestavina celic in sodeluje v številnih kemičnih reakcijah. V tkivih se ne nahaja kot prost kation, temveč je vedno vezano ali vgrajeno v različne beljakovine. Beljakovine s hemom, v katerem se nahaja, so hemoglobin, mioglobin, citokromi, citokrom oksidaza, peroksidaza in druge.

Večina železa v telesu je v hemoglobinu. Preostanek ga je predvsem v mioglobinu, uskladiščeno je tudi v feritinu in hemosiderinu makrofagov kostnega mozga, vranice in jeter (1).

1.3.1 Izgube železa

Telo ohranja železo z izjemno učinkovitostjo. Večina izgub železa pride preko luščenja črevesnih celic, z znojenjem, luščenjem kože ter z urinom, vendar so te količine minimalne.

V fizioloških razmerah izgubljammo vedno skoraj enako količino železa dnevno. Razlike so le glede na spol in starost. Moški ter ženske po rodni dobi izgubijo 1 mg železa dnevno.

Povprečna dnevna količina železa v hrani je 10 do 20 mg. Ženske v rodni dobi izgubljajo železo z menstruacijo, zato imajo manjše zaloge železa kakor moški iste starosti. Z nosečnostjo in porodom pa izgubijo tudi 500 mg železa (1).

1.3.2 Absorpcija železa v prebavilih

Potrebo po železu uravnavamo z absorpcijo železa iz hrane. V hrani je v obliki bodisi hema (mioglobin in hemoglobin) bodisi anorganskih soli (ionsko železo). Pri zdravem človeku se iz hrane absorbira do 10 odstotkov vsega železa, pretežno v dvanajsterniku in jejunumu. Divalentno železo (fero) se lažje absorbira kot trivalentno (feri). Askorbinska in citronska kislina, sladkorji in aminokisliline pospešujejo absorpcijo železa, medtem ko jo zavirajo tanati, karbonati, oksalati, fosfati, nakateri antacidi ...

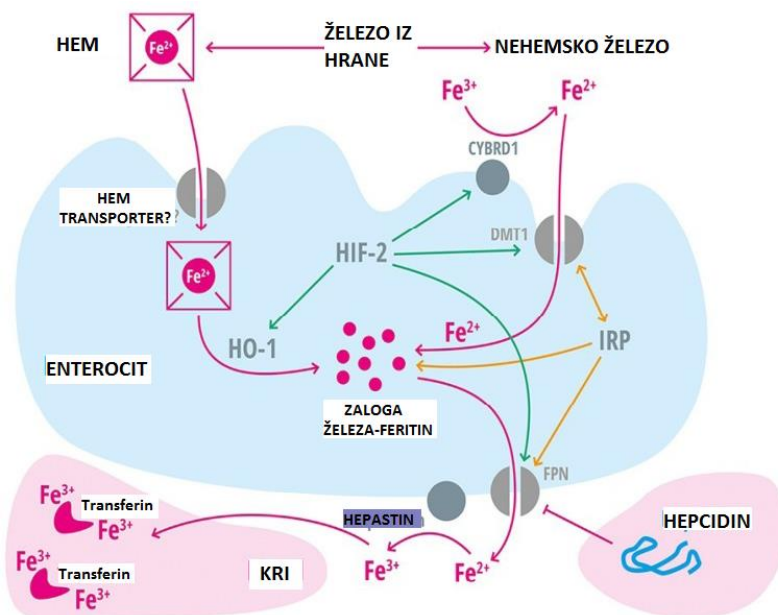
Absorpcija železa v mukoznih celicah dvanajsternika in jejunuma je aktivni proces. Železo iz hrane v nehemi trivalentni obliki se najprej reducira do divalentne oblike z dudenalno citokrom b reduktazo (DcytB), ki je na apikalni strani enterocita (slika 1). Divalentno železo (Fe^{2+}) se tako lahko prenese v enterocitih preko železovega divalentnega transporterja (DMT1 – divalent metal transporter 1).

V hem vezano železo vstopi v enterocit prek hem transporterja. V enterocitu pa se železo sprostí iz hema s hem-oksigenazo 1 (HO-1 – hem oksigenaza 1).

Ko je železo enkrat v citoplazmi, se bodisi shrani na feritinu bodisi prenese v krvni obtok preko prenašalca feroportina (FNP), ki je na lateralni strani enterocita. Izražanje feroportina uravnava hepcidin. To je peptid, ki ga izločajo hepatociti in zavira tako absorpcijo železa iz prebavil kot njegovo sproščanje iz makrofagov. Povečana eritropoeza zavre izločanje hepcidina (slika 1).

Faktor, ki nastane pod pogoji hipoksije (HIF-2 hipoxia inducible faktor), kontrolira izražanje mRNA molekul dudenalne citokrom b reduktaze (DcytB), divalentnega

železovega transporterja (DMT1), feroportina (FPN) in hem-oksigenaze (HO-1) (zelena puščica). Proteini, ki uravnavajo železo (iron regulatory proteins – IRPs), pa po-transkripcijsko kontrolirajo ekspresijo DMT1, feritina in feroportina (oranžna puščica).



Slika 1: Absorpcija železa v enterocitu (povzeto po viru 3)

1.3.3 Transport železa

Ferooksidaza hepastin in ceruloplazmin (Cp) v krvi zopet oksidirata železo do Fe^{3+} , nato se dva atoma železa Fe^{3+} vežeta na transferin (Tf). Transferin je globulin beta, ki se sintetizira večinoma v jetrih.

Na transferin vezano železo tako kroži po krvnem obtoku in zagotavlja železo vsem celicam telesa. Nasičenost transferina je tako glavni kazalec homeostaze železa v telesu, ki se (1) absorbira v črevesju, (2) obnovi iz rdečih krvničk in sprostí iz makrofagov ter (3) porabi za eritropoezo. Pri zdravem človeku je 20–55 odstotkov transferina nasičenega z železom. Transferin z železom se veže na specifična receptorska mesta (transferinski receptor) na eritroblastu. Z aktivnim prenosom (endocitozo) se železo vnaša v celico. V citoplazmi se veže na beljakovino, ki ga prenese do mitohondrijev, kjer se s pomočjo hem sintetaze vključi v protoporfirinski obroč. V hemoglobinu se nahaja več kot 80 odstotkov funkcionalnega železa v telesu.

1.3.4 Zaloge železa

Nekaj železa se uskladišči v obliki feritina in hemosiderina.

Feritin je vodotopen. Sestavljen je iz mnogih podenot lahkih in težkih verig, odvisno od tkiva, v katerem je. Jetrni feritin lahko veže celo do 4500 atomov železa. Hepatociti imajo glavno vlogo pri sintezi feritina. V krvi najdemo le majhno koncentracijo feritina. Koncentracijo serumskega feritina izmerimo na imunokemični in redkeje na radioimunski način in je lahko posredno merilo količine uskladiščenega železa.

Hemosiderin ni vodotopen. Nastane pri razgradnji feritina, ko molekule izgubijo del beljakovinske ovojnice in se agregirajo.

Železo je uskladiščeno predvsem v makrofagih kostnega mozga, vranice in jeter. S citokemično reakcijo na železo lahko ocenimo približno količino uskladiščenega železa v makrofagih in eritroblastih – vidimo redka drobna modra zrnca.

1.3.5 Kroženje železa

Ko je atom železa enkrat v telesu, je praktično v zaprtem sistemu, v katerem je ciklov skoraj neskončno. Iz plazme potuje železo do eritroblastov, kjer se vgradi v hemoglobin. Nato kot zrel eritrocit preide v krvni obtok, kjer kroži približno 120 dni. Ostarele in poškodovane eritrocite fagocitirajo makrofagi v vranici, kostnem mozgu in jetrih (retikuloendotelijski sistem). Iz sproščenega hemoglobina se s hem oksigenazo izloči železo, ki zopet potuje v ekstracelularno tekočino in plazmoin se nato v eritroblastih ponovno uporabi za sintezo hemoglobina.

Jetra imajo ključno funkcijo vzdrževanja homeostaze železa v telesu:

- v jetrih nastajajo glavni proteini, ki uravnavajo železo v ravnovesju,
- v jetrih je glavno mesto za skladiščenje presežnega železa,
- jetra so ključnega pomena za mobilizacijo železa iz hepatocitov v obtok takrat, ko je to potrebno.

Ko jetra niso sposobna regulirati teh treh parametrov, nastanejo težave, povezane z železom (4).

1.4 HEPCIDIN

Hepcidin je peptidni hormon, ki nastane v jetrih kot preprohepcidin. Slednji je sestavljen iz 84 aminokislin. V posttranslacijskih procesih se v kri sprosti biološko aktivni hepcidin, ki je sestavljen iz 25 aminokislin (Hepcidin-25). Hepcidin v krvi kroži kot prost hormon in vezan na α -2-makroglobulin (7). Njegova koncentracija se v dnevu spreminja, manjša je dopoldan, večja je popoldan. Poročajo, da imajo moški večje koncentracije hepcidina kot ženske ter ženske po menopavzi večje koncentracije hepcidina kot ženske pred menopavzo (7).

Hepcidin je sistemski uravnalec železa v telesu. Vstop železa v krvni obtok uravnava na treh glavnih poteh železa:

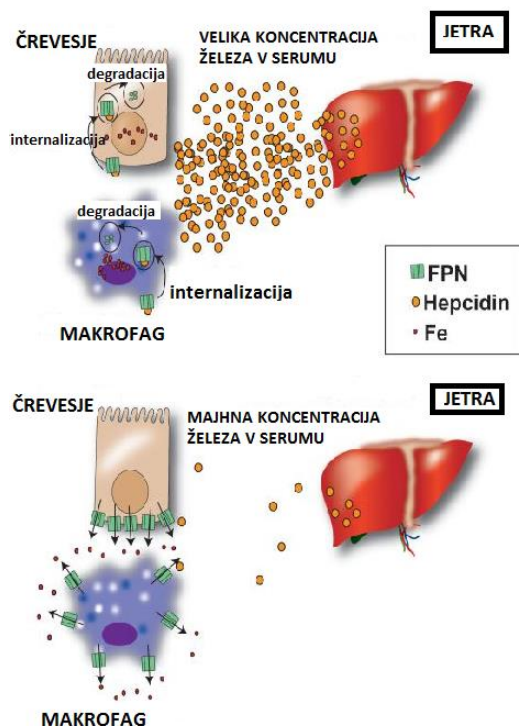
- zavira absorpcijo železa v dvanajsterniku,
- zavira sproščanje ponovno uporabljenega železa iz makrofagov,
- zavira sproščanje železa iz zalog v jetrih.

Hepcidin kontrolira izražanje železovega celičnega transporterja feroportina (FPN) na površini različnih celic, predvsem enterocitov, makrofagov in hepatocitov, ki v največji količini izražajo feroportin. Hepcidin je ligand za feroportin in njuna interakcija povzroči konformacijske spremembe, zato pride do endocitoze in razgradnje kompleksa hepcidin-feroportin. Na ta način hepcidin omeji izražanje feroportina na površini specifičnih celic. Posledično se zmanjša prenos železa iz enterocitov in iz zalog v hepatocitih ter makrofagih v plazmo in ekstracelularno tekočino (slika 2).

Rezultat je torej zvečana koncentracija hepcidina z malim izplavljanjem železa ob višku železa v telesu.

Kadar pa je v telesu premalo železa, se sinteza hepcidina zavre, kar omogoča, da se železo preko feroportina prenese iz enterocita v krvni obtok (slika 2).

Hepcidin se iz telesa odstrani preko ledvic (3, 4, 6 in 7). Le manjši del pride v urin, večji del se ponovno reabsorbira in razgradi v proksimalnih tubulih ledvic (7).



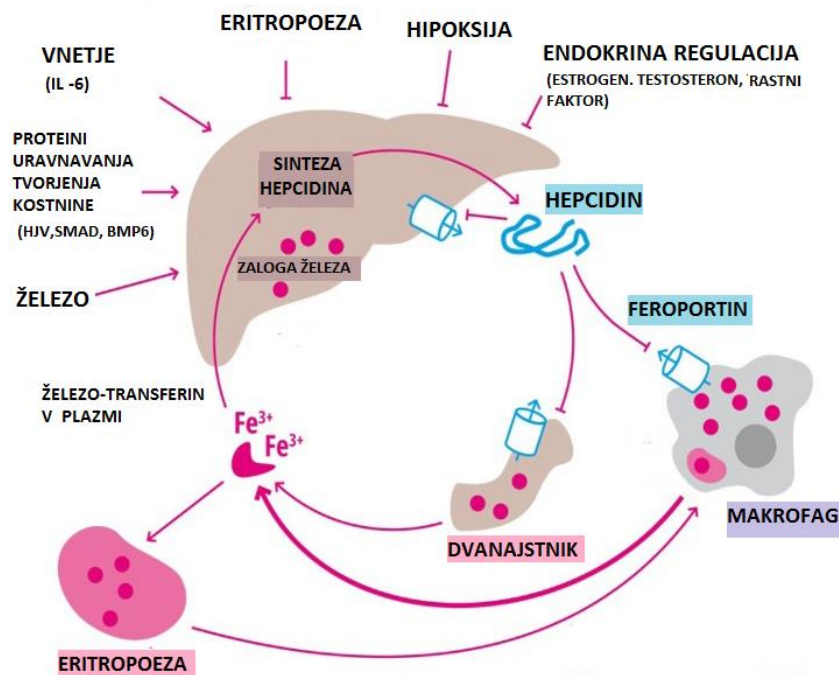
Slika 2: Uravnavanje železa s hepcidinom, FPN-feroportin, Fe-železo (povzeto po viru 4).

1.4.1 Uravnavanje hepcidina

Železo uravnava homeostazo hepcidina. Zvečana raven železa oziroma zvečano nasičenje transferina v plazmi in zvečane zaloge železa v telesu spodbudijo nastajanje hepcidina, ki zavre absorpcijo železa iz prebavil in izločanje iz makrofagov.

Sinteza hepcidina je uravnavana na osnovi različnih dejavnikov (slika 3):

- glede na količino železa v telesu,
- prisotnost vnetja,
- eritropoeza,
- hipoksija,
- endokrini dražljaji,
- proteini uravnavanja tvorjenja kostnine,
- glede na pravilno delovanje ledvic.



Slika 3: Uravnavanje sinteze hepcidina: HJV – hemojuvelin, SMAD – skupina intracelularnih proteinov, ki pretvarjajo signale v celici in tako vplivajo na transkripcijo genov, BMP6 – proteini tvorjenja kostnine, IL-6 – interlevkin 6 (povzeto po viru 3).

1.4.1.1 Uravnavanje koncentracije hepcidina v telesu z železom

Glavni dražljaj uravnavanja hepcidina je njegov substrat železo ter signali, ki kažejo potrebe železa za eritropoezo. Tako železo v plazmi kot zaloge v jetrih uravnavajo transkripcijo železa, in sicer po različnih, a prekrivajočih poteh. Te poti se stekajo v pot proteinov, ki uravnavajo tvorjenje kostnine (BNP = bone morfogenic protein), to je skupina rastnih faktorjev, ki sprožijo zvečano transkripcijo hepcidina. Železo v serumu in zaloge v jetrih aktivira BNP receptor in nato prenese signal preko beljakovine SMAD. Tako se zveča koncentracija sporočilne mRNA za sintezo hepcidina v hepatocitih. Pri tem sodeluje tudi ko-receptor hemojuvelin (8).

Kompleks transferin- Fe^{2+} aktivira transkripcijo hepcidina v hepatocitih, kar zmanjša absorpcijo železa v prebavilih, zmanjša sproščanje iz makrofagov ter hepatocitov (negativna povratna zanka).

Pot ni še popolnoma pojasnjena. Predvidevajo, da naj bi šlo za dva transferinska receptorja, transferinski receptor 1 (TfR1) in transferinski receptor 2 (TfR2), skupaj s HFE (7). HFE se veže na oba receptorja in skupaj imajo funkcijo holotransferina (diferični tranferin). Pri

tej poti sodeluje tudi hemojuvelin (HJV) (slika 4). HFE in transferinski receptor 2 sta gena, ki sta povezana z dedno hemokromatozo pri odraslih.

1.4.1.2 Uravnavanje hepcidina z eritropoezo

Eritropoeza zavira sintezo hepcidina v jetrih.

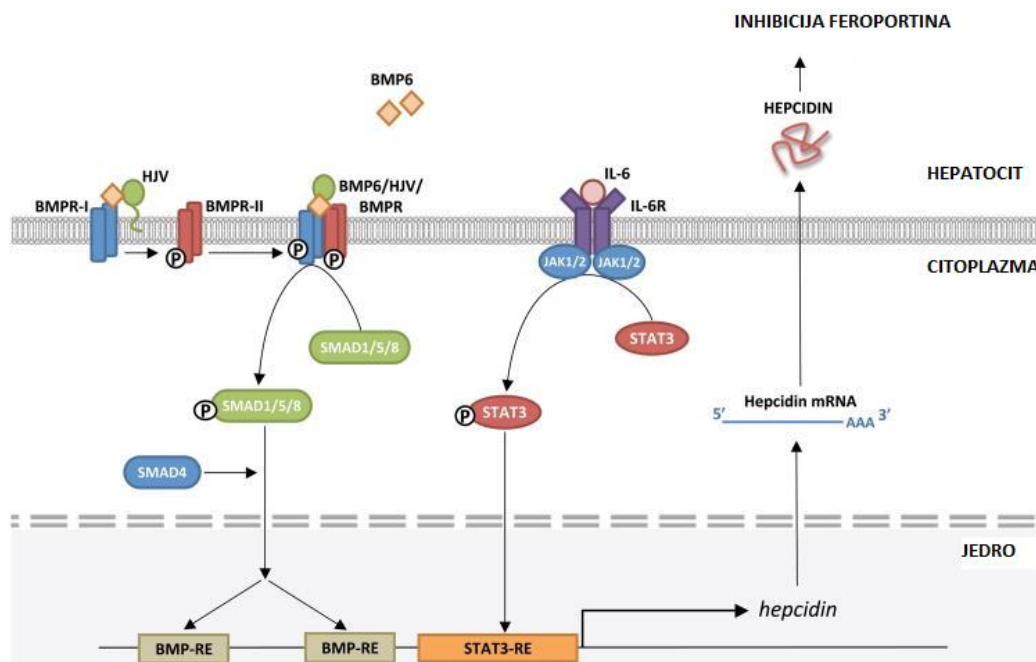
Predhodniki eritrocitov v kostnem mozgu so glavni porabniki železa. Ko se poveča število predhodnikov eritrocitov v kostnem mozgu (zaradi krvavitev, aplikacije eritropoetina), se zavre sinteza hepcidina v jetrih. Tak primer je talasemija, kjer je ob neučinkoviti eritropoezi, ko so predhodniki eritrocitov zelo številčni, vendar propadajo, koncentracija hepcidina konstantno majhna.

Sinteza hepcidina v hepatocitih je kontrolirana na transkripcijski ravni glede na spremembo vrednosti specifičnih transkripcijskih faktorjev v jedru. Interakcije med diferičnim transferinom, proteini tvorjenja kostnine (BMP), interlevkinom-6 (IL-6) ter drugimi vnetnimi citokini, ki na celični površini izražajo receptorje TfR1, TfR2 in hemojuvelin (HJV) in IL-6, uravnavajo sintezo hepcidina po različnih poteh (slika 4) (5).

1.4.1.3 Vnetje

Aktivirani makrofagi med okužbami in vnetji skupaj z drugimi citokini izločajo tudi interlevkin -6 (IL-6), ki je eden glavnih signalov za sintezo hepcidina.

IL-6 aktivira sintezo hepcidina tako, da sproži vezavo STAT-3 (pretvornik signala in aktivator traskriptaze 3, Signal transducer and activator of transcription 3) na promotor za hepcidin (slika 4). S hepcidinom povzročena hipoferemija se razvije zgodaj med okužbo ali vnetno boleznijo. To je obrambni mehanizem proti specifičnim mikroorganizmom (zavira od Fe odvisne mikroorganizme). Zaradi zvečanega hepcidina na račun obrambe proti specifičnim mikroorganizmom se zmanjša razpoložljivost Fe za eritropoezo, kar lahko prispeva k anemiji zaradi vnetja. Tako nastane anemija zaradi kronične bolezni.



Slika 4: Uravnavanje hepcidina z BMP-HJV-SMAD in IL-6-STAT3 signalnimi potmi (povzeto po viru 11).

1.4.1.4 Hipoksija

Hipoksija stimulira produkcijo eritropoetina in eritropoezo. HIF je glavni transkripcijski faktor, ki se aktivira med hipoksijo in zavre sintezo hepcidina. Pod pogoji hipoksije se HIF 1 in HIF 2 stabilizirata, kar povzroči transkripcijo številnih od železa odvisnih genov (TtR1, Tr, ceruloplazmin, FPN1) (4).

1.4.1.5 Endokrino uravnavanje

Rastni hormoni kontrolirajo serumsko železo in ekspresijo gena za hepcidin. Rastni faktorji zmanjšajo raven hepcidina. Tudi spolni hormoni vplivajo na hepcidin, zato tudi razlika v koncentraciji med spoloma (4).

1.4.1.6 Izguba hepcidina prek ledvic

Zaradi majhne mase se hepcidin filtrira v glomerulih, a se večina reabsorbira v proksimalnih tubulih, kjer se razgradi. Manjši del izločimo z urinom, kjer ga tudi lahko detektiramo. Ob kronični ledvični bolezni se hepcidin ne filtrira, zato je zvečana koncentracija v plazmi, kar lahko povzroči anemijo ob kronični ledvični bolezni. Hepcidin pa se očisti na dializi (7).

1.4.2 Bolezenska stanja, povezana s povečano koncentracijo hepcidina ali pomanjkanjem feroportina

1.4.2.1 Anemija zaradi pomanjkanja železa

Pri anemiji zaradi pomanjkanja železa (APŽ) je koncentracija hepcidina zelo majhna, pri določenih metodah celo pod mejo določljivosti. Celo brez prisotne anemije je hepcidin občutljiv indikator pomanjkanja železa. Znižana koncentracija hepcidina je skupaj z znižano nasičenostjo transferina in znižanim feritinom zgodnji kazalec pomanjkanja železa.

1.4.2.2 Refraktarna anemija s pomanjkanjem železa

Refraktarna anemija s pomanjkanjem železa (RAPŽ) je genetsko povzročena hipokromna mikrocitna anemija. Zaradi mutacije v genu transmembranska serinska proteaza 6 (TMPRSS6), ki kodira supresorsko matriptazo-2, pride do povečane produkcije hepcidina. Posledično pride do kronične inhibicije absorpcije železa in s tem do kronične anemije.

1.4.2.3 Anemija zaradi kroničnih bolezni in vnetij

Anemija zaradi kroničnih bolezni je druga najpogostejša oblika anemije po svetu. V to skupino spadajo bolniki s kroničnimi vnetnimi, infekcijskimi in malignimi boleznimi. Kot je opisano že v prejšnjem poglavju, je hepcidin protein akutne faze. S hepcidinom povzročena hipoferemija se razvije zgodaj med infekcijo ali vnetno boleznijo. To je obrambni mehanizem proti specifičnim mikroorganizmom (zavira od železa odvisne mikroorganizme). Zaradi povišanega hepcidina na račun obrambe proti specifičnim mikroorganizmom se zmanjša razpoložljivost Fe za eritropoezo, kar prispeva k anemiji zaradi vnetja. Tako nastane anemija zaradi kroničnih bolezni in vnetij (AKV).

1.4.2.4 Anemija pri kronični ledvični bolezni

Do anemije pri kronični ledvični bolezni (AKL) pride v glavnem zaradi pomanjkanja eritropoetina (EPO). Ledvice igrajo pomembno vlogo pri izločanju hepcidina iz telesa. Pri bolnikih z ledvično boleznijo se hepcidin ne more izločiti iz telesa, zato se kopiči v ledvicah in razvije se hiposideropenična anemija (14).

1.4.3 Bolezenska stanja, povezana s pomanjkanjem hepcidina ali rezistenco na njegovo delovanje

1.4.3.1 Dedna hemokromatoza (DH) je skupina genetskih motenj v homeostazi železa, ki nastanejo zaradi mutacij v genih, ki kodirajo regulatorje hepcidina, kot so HFE, TfR2,

hemojuvelin, ali sam hepcidin. Zaradi neučinkovite sinteze hepcidina v jetrih pride do povečane absorpcije železa v črevesju, kar vodi do kopičenja železa v tkivih, poškodb organov, ki se lahko končajo tudi z jetrno cirozo ali rakom jeter. Stopnja pomanjkanja hepcidina korelira z resnostjo bolezni. Mutacije v genu za HJV ali hepcidin, pri kateri praktično nimamo hepcidina, se kažejo kot zelo huda bolezen. Pri juvenilni hemokromatozi, pri kateri gre za mutacijo v genu za HFE ali TfR2, pa imamo še aktivnega nekaj hepcidina, zato je bolezen manj huda.

Poznamo tudi sekundarno hemokromatozo kot posledico neke druge bolezni, ki povzroča kopičenje železa v jetrih. Tak primer je talasemija.

1.4.3.2 Anemija z odlaganjem železa

Talasemije so skupina bolezni, pri katerih gre za dedno nezadostno tvorbo ene ali dveh vrst globinskih verig, zato celice odmrejo že v kostnem mozgu. Gre za neučinkovito eritropoezo.

Pri bolnikih s hudo obliko talasemije, ki jo zdravimo s transfuzijami eritrocitov, se v tkivih kopiči železo. Kopičenje železa najbolj poškoduje srce, jetra in endokrine žleze.

Povečana eritropoeza in zmanjšana prilagoditev koncentracije hepcidina na presežek železa zavre signal za sintezo samega hepcidina.

Pri bolnikih, ki imajo redne transfuzije, so vrednosti hepcidina močno višje kot pri bolnikih, ki transfuzij ne prejema (14).

1.4.4 Diagnostične in terapevtske možnosti hepcidina

1.4.4.1 Določanje hepcidina v krvi in drugih telesnih tekočinah

Hepcidin-25 je za določitev zelo problematičen. Je zelo majhna molekula s številnimi epitopi, zato je zapleteno narediti protitelesa, ki bi se lahko rutinsko uporabljala v laboratoriju. Največje težave so zaradi:

- različnih raztopin kalibratorjev, nimamo referenčnega standarda v metodi,
- hepcidin se v krvi veže na albumin in α -2-makroglobulin,
- hepcidin obstaja v 3 izofornih oblikah, imenovanih hepcidin 25, 22 in 20 (12).

Hepcidin ima cirkadianen ritem, zjutraj je v nižjih koncentracijah in popoldan v višjih. Razlika je tudi v spolu – moški imajo večje koncentracije kot ženske (7).

Na splošno poznamo dve analizni metodi za določanje hepcidina:

- Prva analizna metoda je masna spektrometrija (MS), kjer se hepcidin najprej ionizira, nato razvrsti glede na razmerje masa/naboj in procesira v masnem spektru, izmeri se intenziteto pika (pikov) ter primerja s pikom internega standarda. Obstajajo številne variacije in modifikacije masne spektrometrije: HPLC-MS/MS, MALDI-TOF MS ...

Prednost MS je, da je sposobna ločiti, razlikovati ter določiti koncentracijo biološko aktivne oblike Heparin-25. Ta metoda je zelo draga, saj za izvedbo potrebujemo posebne inštrumente ter strokovnjake za delo na njih (10).

- Druga analizna metoda je encimsko imunski test na trdnih nosilcih (ELISA) s protitelesi proti hepcidinu, kjer se kot referenčni standard uporablja sintetični hepcidin.

ELISA je poceni in enostavna. Glavna omejitev je majhna specifičnost protiteles proti hepcidinu-25. Drugi dve izoformi hepcidina lahko motita določitev in zato dobimo lažne večje vrednosti.

V študiji so Dallalio in sodelavci za določanje koncentracije hepcidina v serumu uporabili analizno metodo Western blot, pri kateri so proteine seruma skupaj s standardom hepcidina najprej elektroforetsko ločili na določenem gelu za western blot. Nato so vzorce elektroforetsko prenesli na nitrocelulozno membrano. Nanjo so vezali zajčja protitelesa proti 13-AK dolgo zaporedje na hepcidinu. Po spiranju so dodali še protitelesa proti zajčjim protitelesom, kar pa so lahko zaznali s kemiluminiscenco. Z ustrezno obdelavo so na koncu dobili rezultate o koncentraciji hepcidina v vzorcu (9).

1.4.4.2 Možnosti zdravljanja z uravnavanjem ravni hepcidina

Zaradi ključne vloge hepcidina pri uravnavanju železa bi njegove antagoniste oziroma agoniste lahko potencialno uporabili v klinični praksi.

Agonisti hepcidina

Agoniste hepcidina bi lahko uporabljali za zdravljenje ali preprečevanje bolezni kopičenja železa, kot sta hereditarna hemokromatoza in β -talasemija.

Spojine, ki lahko posnemajo funkcijo hepcidina ali pa potencirajo njegovo endogeno sintezo, bi lahko preprečile kopičenje železa v telesu. Te spojine bi lahko zagotovile dodatno oziroma nadomestno zdravljenje pri bolnikih, ki slabo prenašajo standardne načine zdravljenja, kot so kelacija železa in plebotomija (8).

Antagonisti hepcidina

Antagoniste hepcidina bi lahko uporabljali pri zdravljenju bolezni zaradi zvečanega hepcidina, kot je anemija zaradi kroničnih bolezni in vnetij.

Sintezo hepcidina bi z antagonisti zmanjšali, kar pa bi povečalo razpoložljivost železa za eritropoezo. Sintezo hepcidina bi lahko zavrlili z inhibicijo njegove produkcije, nevtralizacijo peptida hepcidin, z blokiranjem vezave s feroportinom ali preprečevanjem endozitoze feroportina ter s spodbujanjem sinteze feroportina (8). Protitelo proti receptorju anti-IL-6R je eden takih agensov, ki je pri opicah zmanjšal koncentracijo hepcidina in tako izboljšal stanje anemije zaradi vnetja. Hemojuvelin (HJV), ko-receptor za BNP, ki je ključnega pomena za izražanje hepcidina, je še ena molekulska tarča, ki jo lahko izkoristimo za vplivanje na produkcijo hepcidina. Topni HJV zmanjša SMAD signalizacijo in tako zmanjša nivo hepcidina (8).

2 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen:

- V rutinsko prakso želimo vpeljati analizno metodo za določanje koncentracije hepcidina v serumu z imunskim načinom na mikrotitrskih ploščah (ELISA, angleško enzyme linked immunosorbent assay).
- Analizno metodo bomo delno validirali. Na izbranih vzorcih preiskovancev želimo določiti natančnost in območje linearnosti analizne metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu. Natančnost analizne metode bomo določili s ponovljivostjo rezultatov "v seriji" in "med serijami" meritev.
- Postaviti želimo lastne orientacijske referenčne vrednosti za določitev koncentracije hepcidina na vsaj 40 preiskovanih serumih zdravih oseb, ki jih bomo zbrali od zaposlenih v Specializiranem hematološkem laboratoriju ter na Kliničnem oddelku za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Pogoj za vključitev preiskovancev v skupino zdravih je normalna krvna slika, ki jo bomo napravili s hematološkim analizatorjem.
- Določiti želimo koncentracijo hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni in dobljene rezultate primerjati med skupinama in z zdravimi preiskovanci.
- Primerjati želimo koncentracijo hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni s preiskavami, ki se v klinični praksi uporabljajo za oceno stanja zaloga železa in učinkovite eritropoeze. To so parametri rdeče krvne slike, koncentracija železa v serumu, koncentracija feritina v serumu, koncentracija topnega transferinskega receptorja v serumu, feritinski indeks, nasičenost transferina v serumu in celotna vezalna kapaciteta za železo.

Hipoteze:

Domnevamo, da:

- bodo rezultati natančnosti in linearnosti analizne metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu primerljivi z navedbami proizvajalca,
- bodo postavljene orientacijske referenčne vrednosti primerljive z referenčnimi vrednostmi, ki jih je navedel proizvajalec ali so navedene v literaturi,
- je koncentracija hepcidina v primerjavi s skupino zdravih preiskovancev zmanjšana pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in zvečana pri bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni,
- da bodo koncentracije hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni statistično značilno povezane s koncentracijo železa, feritina, topnega transferinskega receptorja, feritinskim indeksom, zasičenostjo transferina, celotno vezalno kapaciteto za železo in parametri rdeče krvne slike, kot so hematokrit, eritrocitni indeksi (povprečni volumen eritrocitov, povprečna količina hemoglobina v eritrocitih, povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih), delež hipohromnih eritrocitov, delež in koncentracija retikulocitov, vsebnost hemoglobina v retikulocitih.

3 VZORCI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 56 zdravih oseb, 29 žensk (52 odstotkov) in 27 moških (48 odstotkov). Vzorce zdravih oseb smo dobili od sodelavcev iz Specializiranega hematološkega laboratorija kliničnega oddelka za hematologijo (SHL) ter od zdravstvenega osebja KO za hematologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana. Mediana starosti je bila 29 let, razpon od 20 let do 60 let. Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Preiskovancem smo napravili krvno sliko. Med zdrave preiskovance smo vključili osebe z normalno krvno sliko.

V preiskavo smo vključili 16 bolnikov s sumom na anemijo zaradi pomanjkanja železa. Imeli smo 2 moška (13 odstotkov) in 14 žensk (87 odstotkov). Mediana starosti je bila 45 let, razpon od 21 do 83 let. Vzorce bolnikov smo dobili iz hematološke ambulante KO za hematologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana. Vsem preiskovancem smo napravili krvno sliko in biokemične preiskave za oceno stanja zalog železa in učinkovite eritropoeze ter koncentracijo hepcidina in eritropoetina.

Poleg zdravih preiskovancev in bolnikov z anemijo zaradi pomanjkanja železa smo v preiskavo vključili tudi 24 bolnikov s kronično ledvično boleznijo. Žensk je bilo 10 (42 odstotkov) in 14 (58 odstotkov) moških. Mediana starosti je bila 63 let, razpon od 45 do 86 let. Vsem preiskovancem smo napravili krvno sliko in biokemične preiskave za oceno stanja zalog železa in učinkovite eritropoeze ter koncentracijo hepcidina in eritropoetina.

Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

3.2 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV

Za krvno sliko smo kri odvzeli v 3-mL epruveto z antikoagulantom K_3EDTA (trikalijeva sol etilendiamintetraocetne kisline). Za biokemične preiskave in določitev koncentracije hepcidina ter eritropoetina smo kri odvzeli v epruveto brez antikoagulanta, namenjeno za pridobitev seruma. To epruveto smo pustili stati pokončno na sobni temperaturi vsaj 30 minut, da se je naredil strdek. Nato smo vzorce centrifugirali v centrifugi Labofuge 400 (Heraeus) pri sobni temperaturi in 2500 obratih (centrifugalna sila $1153 \times g$) 10 minut. Za analizo smo uporabili dobljen serum. Vzorec seruma smo oddelili v 4 mikrocentrifugirke (1,5 mL) po 0,2 mL seruma in zamrznili na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Serum smo pred analizo odmrznili v inkubatorju na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (GFL 7601) za 5 minut in dobro premešali. Odmrznjenih serumov nismo ponovno zamrznili.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Določitev hematoloških in biokemičnih preiskav krvi ter referenčne vrednosti

Določitev biokemičnih preiskav v serumu Fe, TIBC, Feritin, CRP, nasičenje transferina, topni transferinski receptor so napravili v laboratorijih kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana. Preiskave Fe, TIBC in CRP so izvedli na biokemičnem analizatorju ADVIA 1800 (Siemens, Nemčija). Preiskavo Feritin so izvedli na imunokemičnem analizatorju Advia CENTAUR XP (Siemens, Nemčija). Topni transferinski receptor so izvedli na BSC XP (Siemens, Nemčija).

Princip določitve koncentracije železa (III), je sledeč: železo (III), ki je vezano na transferin, se po nakisanju sprost iz transferina. Z askorbinsko kislino ga reduciramo v železo (II) (Fe^{2+}). Železo Fe^{2+} se veže z barvilom, absorbanco izmerimo sprektrofotometrično.

Princip merjenja TIBC je spektrofotometričen. Vzorcju seruma dodamo kisel reagent, ki vsebuje železo in barvilo. Vezano železo se zaradi kislega reagenta sprost. Nato dodamo drugi reagent, ki je nevtralen. Zaradi spremembe pH se železo veže in nasiči transferin v vzorcju. Zmanjšanje absorbance je direktno sorazmerno kapaciteti za vezavo železa na transferin.

UIBC izračunamo iz razlike med TIBC in koncentracijo železa ($UIBC = TIBC - \text{koncentracija železa v serumu}$).

CRP smo določili z imunskim analiznim postopkom z lateks delci. Lateks delci so prekriti s protitelesi proti CRP (anti-CRP). V prisotnosti CRP se lateks delci aglutinirajo. Stopnjo aglutinacije določimo turbidimetrično.

Določitev koncentracije ferritina smo izmerili z analiznim postopkom kemiluminiscence z uporabo protiteles proti ferritinu. Pri analizi uporabimo konstanto koncentracijo dveh protiteles proti ferritinu. Prvo protitelo proti ferritinu je poliklonalno kozje protitelo (anti-ferritin), ki je označeno z akridinin estrom. Drugo protitelo je monoklonsko mišje protitelo, na katerega so kovalentno vezani paramagnetni delci. Po inkubiranju, ločevanju, aspiriranju, spiranju ter dodajanju kislega in bazičnega reagenta merimo kemiluminescenčno reakcijo. Koncentracija ferritina je sorazmerna izmerjeni kemiluminescenci.

Topni transferinski receptor (sTrR) smo določili z imunskim analiznim postopkom z lateks delci.

Polistirenski delci so prekriti z monoklonskimi protitelesi proti človeškemu topnemu transferinskemu receptorju. Ko dodamo vzorec seruma, v katerem so topni transferinski receptorji, pride do aglutinacije delcev. Stopnja aglutinacije je sorazmerna koncentraciji topnih transferinskih receptorjev v serumu. Določimo jo nefelometrično.

Nasičenost transferina (SatTr) izračunamo iz formule:

$$\text{SatTr (\%)} = \text{Fe} \times 100 / \text{TIBC}$$

Določitev koncentracije eritropoetina smo izvedli z imunskim analiznim postopkom na trdnih nosilcih (ELISA).

Krvno sliko zdravih dajalcev smo napravili s hematološkim analizatorjem Beckman Coulter LH 750 (Beckman Coulter, ZDA). Štetje in ocena lastnosti krvnih celic sta potekala s pomočjo kombinacije električnih in optičnih meritev. Krvno sliko bolnikov s sumom na pomanjkanje železa in bolnikov s kronično ledvično boleznijo smo napravili s hematološkim analizatorjem Sysmex XN 1000 (Sysmex, Japonska). Ta aparat napravi krvno sliko po principu fluorescenčne pretočne citometrije.

Referenčni intervali preiskav, ki smo jih pri magistrski nalogi uporabili, so prikazani v preglednici I.

Preglednica I: Referenčne vrednosti preiskav krvne slike ter biokemičnih parametrov, ki smo jih uporabili pri preiskavi.

VZOREC	PREISKAVA	REFERENČNI INTERVAL
kri z EDTA	LKCI MOŠKI ($10^9/L$)	3,70 - 9,5
kri z EDTA	LKCI ŽENSKE ($10^9/L$)	3,9 - 11,1
kri z EDTA	ERCI MOŠKI ($10^{12}/L$)	4,32 - 5,66
kri z EDTA	ERCI ŽENSKE ($10^{12}/L$)	3,88 - 4,99
kri z EDTA	Hb MOŠKI (g/L)	133 - 167
kri z EDTA	Hb ŽENSKE (g/L)	118 - 148
kri z EDTA	HCT MOŠKI (/)	0,39 - 0,50
kri z EDTA	HCT ŽENSKE (/)	0,36 - 0,44
kri z EDTA	PVE (fL)	82 - 98
kri z EDTA	PHE (pg)	27,3 - 32,6
kri z EDTA	PKHE (pg)	316 - 349
kri z EDTA	KVVE (%)	9,9 - 15,5
kri z EDTA	RET (%)	0,4 - 2,5
kri z EDTA	Ret Hb (pg)	28 - 35
kri z EDTA	Hipo Erci (%)	<2,7
kri z EDTA	TRCI ($10^9/L$)	157 - 384
serum	Fe ($\mu\text{mol}/L$)	10,7 - 28,6
serum	feritin ($\mu\text{g}/L$)	20 - 300
serum	UIBC ($\mu\text{mol}/L$)	38,5 - 46,6
serum	TIBC ($\mu\text{mol}/L$)	44,8 - 80,6
serum	sTfR (mg/L)	0,83 - 1,76
serum	sat Tf (%)	15 - 45
serum	CRP (mg/L)	0 - 5,0
serum	EPO (E/mL)	3,3 - 16,6

LKCI – levkociti, ERCI – eritrociti, Hb – hemoglobin, HCT – hematokrit, PVE – povprečni volumen eritrocitov, PHE – povprečna količina hemoglobina v eritrocitih, PKHE – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu, KVVE – koeficient variacije volumna eritrocitov, RET (%) – delež retikulocitov, RET Hb – hemoglobin v eritrocitih,

Hipo Erci – delež hipokromnih eritrocitov, TRCI – trombociti, Fe – železo, UIBC – prosta vezalna sposobnost seruma za železo, TIBC – celotna vezalna sposobnost seruma za železo, sTfR – topni transferinski receptor, sat Tf – nasičenost transferina, CRP – C-reaktivni protein, EPO – eritropoetin

3.3.2 Določitev koncentracije hepcidina v serumu

Za določitev koncentracije hepcidina v serumu smo uporabili reagenčni komplet Hepcidin-25 (bioactive) ELISA, s kataložsko številko EIA-5258, proizvajalca DRG Instruments GmbH, Nemčija. Reagenčni komplet vsebuje:

- mikrotitrsko ploščo (96 luknjic),
- standarde od 0–5 ng/mL (koncentracije 0-2-6,5-25-45-80 ng/mL, pretvorba 1ng/mL = 0,358 nmol/L), 6 stekleničk, liofolizirani,
- reakcijski pufer, 1 steklenička, 14 mL, pripravljen za uporabo,
- encimski konjugat, 1 steklenička, 7 mL, pripravljen za uporabo,
- encimski kompleks, 1 steklenička, 14 mL, pripravljen za uporabo,
- raztopino substrata, 1 steklenička, 14 mL, pripravljena za uporabo,
- stop raztopino, 1 steklenička, 14 mL, pripravljena za uporabo (0,5 M H₂SO₄),
- raztopino za spiranje, 1 steklenička, 30 mL (40-krat koncentrirana,
- adhezivno folijo

3.3.2.1 Priprava in obstojnost reagentov, standardov ter kontrol in vzorcev

- Standardi: Raztopimo jih z 0,2 mL redestilirane vode in pustimo stati vsaj 10 min. Raztopljeni so stabilni 2 dni pri 2–8 °C oziroma zamrznjeni na –20 °C za daljše obdobje.
- Kontrole: Raztopimo jih z 0,2 mL redestilirane vode in pustimo stati vsaj 10 min. Raztopljeni so stabilni 2 dni pri 2–8 °C oziroma zamrznjeni na –20 °C za daljše obdobje.
- Raztopina za spiranje: Pufer (40-krat redčimo z redestilirano vodo (5 mL koncentriranega spiralnega (Wash) pufru + 195 mL redestilirane vode). Vsakič pripravimo svežo redčitev.

- Vzorci serumov bolnikov: Pred analizo serume odmrzujemo v inkubatorju na 37 °C (GFL 7601) in dobro premešamo. Tako je vzorec pripravljen za analizo.

3.3.2.2 Priprava vzorcev za določitev območja linearnosti metode

Da bi določili območje linearnosti analitične metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu, smo vzorce pred analizo redčili.

Izbrali smo 3 vzorce, ki so imeli različne koncentracije hepcidina. Vzorce smo serijsko redčili z reakcijskim pufrom tako, da smo za vsak vzorec izvedli po 5 oziroma 6 meritev (1, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 in 1/32).

Za vsak vzorec smo pripravili 7 epruvet, jih ustrezno označili ter v vsako razen prve napipetirali po 50 μ L reakcijskega pufru. Nato smo v prvo (1(1)) in drugo epruveto (2(1/2)) napipetirali 50 μ L vzorca. Tako smo dobili v prvi (1) epruveti neredčen, v drugi (2) pa redčen vzorec 1/2. Iz druge ((2)1/2) epruvete smo nato prenesli 50 μ L v tretjo 3. (1/4), dobro premešali in spet 50 μ L mešanice 3 prenesli v 4. epruveto in tako naprej do zadnje epruvete (slika 5).

	1(neredčen vzorec)	2 (1/2)	3 (1/4)	4 (1/8)	5 (1/16)	6 (1/32)
vzorec (μ L)	50	50	50	50	50	50
pufer (μ L)		50	50	50	50	50
redčitev	neredčen vzorec	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

Slika 5: Serijska redčitev vzorcev za določitev linearnosti metode

Pripravljene vzorce smo pipetirali v vdolbinice v dvojniku.

Vse ostale reagente, kontrole in standarde za določitev linearnosti metode smo pripravili enako kot za redno delo, to je po navodilih proizvajalca (poglavje 3.3.2.1).

3.3.2.3 Priprava vzorcev za določitev natančnosti metode

Natančnost analizne metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo določili s ponovljivostjo v seriji in med serijami meritev koncentracije hepcidina 4 različnih vzorcev. Analize smo izvedli v triplikatu. Predhodno jih nismo redčili, tako kot ne vzorcev

preiskovancev. Razlika je le ta, da smo vsak vzorec napipetirali trikrat (v treh duplikatih – 6 luknjic) in tako za vsak vzorec dobili 3 vrednosti za koncentracijo hepcidina.

Ponovljivost med serijami smo določili v 3 različnih dneh.

3.3.3 Instrumenti in oprema

Instrumenti in oprema, ki smo jih uporabljali pri raziskavi/analizi, so: centrifuga Labofuge 400 (Heraeus) ali njeni analogi, čitalec mikrotitrskih plošč AD 340C (Beckman Coulter, ZDA), hematološki analizator Sysmex XN-1000 (Sysmex, Japonska), hematološki analizator Beckman Coulter LH 750 (Beckman Coulter, ZDA), stresalnik Sorin Biomedica ETI-System (Sorin Biomedica, Italija) ali njegovi analogi, pipete in nastavki za pipete.

3.3.4 Delovni postopek

Pred uporabo morajo vsi reagenti, vzorci in kontrole doseči sobno temperaturo. Vse reagente in vzorce smo pred uporabo premešali.

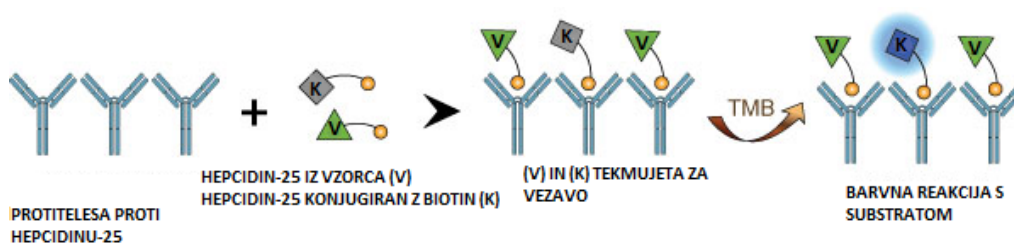
Z mikrotitrskeske plošče odstranimo zaščitno folijo. Neuporabljene stripe takoj shranimo na temperaturo od 2 do 8 °C.

1. Pipetiramo **100 µL reakcijskega pufra** v ustrezne vdolbinice.
2. Pipetiramo **20 µL** standardov, kontrol in vzorcev v ustrezne vdolbinice (slika 7).
3. Pipetiramo **50 µL encimskega konjugata** v vse vdolbinice in mešamo 10 s.
4. Inkubiramo **60 minut** na sobni temperaturi na **stresalniku** pri 300–700 rpm.
5. Vsebino aspiriramo in nato **4-krat** spiramo s **300 µL pufra za spiranje**, nato obrnemo ploščico na vpojno brisačko in z udarjanjem odstranimo vse kapljice.
6. Pipetiramo **100 µL encimskega kompleksa** v vdolbinice.
7. Inkubiramo **30 min** na sobni temperaturi.
8. Vsebino aspiriramo in nato **4-krat** spiramo s **300 µL pufra za spiranje**, nato obrnemo ploščico na vpojno brisačko in z udarjanjem odstranimo vse kapljice.
9. Pipetiramo **100 µL raztopine substrata**.
10. Inkubiramo **20 min** na sobni temperaturi.

11. Po 20 min ustavimo reakcijo s **100 μ L stop raztopine**.

V 10 minutah po ustavitvi reakcije smo izmerili absorbanco pri 450 ± 10 nm na čitalcu mikrotitrskih plošč AD 340 (slika 9).

Princip testa je encim imunski način na trdnih nosilcih (ELISA – enzyme linked immunosorbent ssay), ki temelji na kompetitivni vezavi. Mikrotitrške plošče so prekrte z mišjimi monoklonskimi protitelesi direktno proti antigenski determinanti na molekuli hepcidin-25 (slika 6). Endogeni hepcidin, ki je v vzorcu, tekmuje s konjugatom Hepcidin-25-biotin, ki pa je v reagentu za vezavo na monoklonsko protitelo vezano na ploščo. Po inkubaciji nevezan konjugat speremo s pufrom ter dodamo kompleks streptavidin-peroksidaza. Po inkubaciji zopet speremo nevezan kompleks s plošče. V naslednjem koraku dodamo substrat, ki ga peroksidaza pretvori, in nastane modra barva. Točno po 20 minutah zaustavimo reakcijo z 0,5 M žveplovo kislino. Modra barva se spremeni v rumeno, katere absorbanco merimo. Ker imamo kompetitivno tehniko, je intenziteta barve obratno sorazmerna s koncentracijo hepcidina v vzorcu. Pri standardu z najnižjo koncentracijo bomo torej dobili najvišjo absorbanco, pri najvišji koncentraciji standarda pa najnižjo absorbanco.



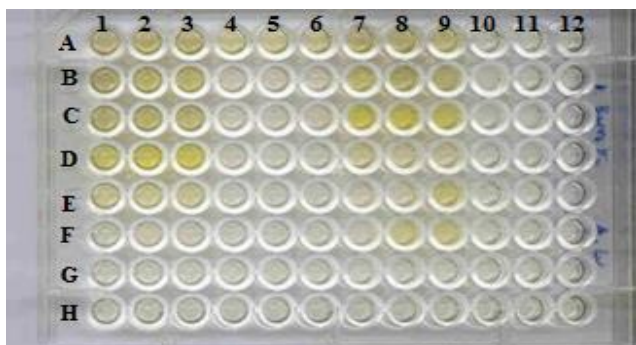
Slika 6: Princip testa hepcidin (povzeto po viru 13).

Aparat je izmeril absorbance v končni točki in narisal umeritveno krivuljo (uporabili smo 4 parameter fit z 10-odstotno ekstrapolacijo). Rezultate smo natisnili ter preverili vrednost kontrolnih vzorcev, ali so v predpisanih mejah, ki jih definira proizvajalec. Če so bile vrednosti kontrolnih vzorcev znotraj teh meja, smo rezultate lahko uporabili, v nasprotnem primeru pa smo morali analizo ponoviti.

Rezultate nam je aparat podal v ng/mL, vendar pa jih je bilo potrebno pretvoriti v nmol/L. To smo naredili tako, da smo ng/mL delili z molekularno maso hepcidina (M_r hepcidina-25 = 1789). Zato je prevorba $1 \text{ ng/mL} = 0,358 \text{ nmol/L}$ (ng/mL delimo z 2,79).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SD 0	SD 0	vz 1	vz 1	vz 9	vz 9	vz 17	vz 17	vz 25	vz 25	vz 33	vz 33
B	SD 1	SD 1	vz 2	vz 2	vz 10	vz 10	vz 18	vz 18	vz 26	vz 26	vz 34	vz 34
C	SD 2	SD 2	vz 3	vz 3	vz 11	vz 11	vz 19	vz 19	vz 27	vz 27	vz 35	vz 35
D	SD 3	SD 3	vz 4	vz 4	vz 12	vz 12	vz 20	vz 20	vz 28	vz 28	vz 36	vz 36
E	SD 4	SD 4	vz 5	vz 5	vz 13	vz 13	vz 21	vz 21	vz 29	vz 29	vz 37	vz 37
F	SD 5	SD 5	vz 6	vz 6	vz 14	vz 14	vz 22	vz 22	vz 30	vz 30	vz 38	vz 38
G	LOW K	LOW K	vz 7	vz 7	vz 15	vz 15	vz 23	vz 23	vz 31	vz 31	vz 39	vz 39
H	HIGH K	HIGH K	vz 8	vz 8	vz 16	vz 16	vz 24	vz 24	vz 32	vz 32	vz 40	vz 40

Slika 7: Shema pipetiranja na mikrotirsko ploščo



Slika 8: Mikrotirska plošča

Slika 8 prikazuje mikrotitrsko ploščo po končani barvni reakciji, ko je že dodana kislina za ustavitev barvne reakcije. V dolbinici A1 in A2 predstavljata standard 0, ki ima najmočnejšo intenziteto barve, F1 in F2 predstavljata standard z največjo koncentracijo in najmanjšo intenziteto barve (slika 8).



Slika 9 : Čitalec mikrotitrskih plošč AD 340 (Beckman Coulter, ZDA)

3.6 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

Za opisno statistiko in določitev natančnosti (ponovljivosti) analizne metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo uporabili program Microsoft Excel 2010. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardne odklone, minimum in maksimum. S pomočjo programa Microsoft Excel 2010 smo z metodo linearne regresije in izračunom koeficienta variacije ter determinacijskega koeficienta ugotavljali območje linearnosti določanja koncentracije hepcidina. Ponovljivost "v seriji" in "med serijami" analiz smo podali s koeficientom variacije.

Za izračun referenčnih vrednosti smo uporabili program MedCalc Statistical software, verzija 13.1.0 (MedCalc software bvba, Ostend, Belgija).

S Shapiro-Wilksovim testom smo preverili, ali je porazdelitev parametrov normalna. Z Tukeyevo metodo smo ugotavljali osamelce in ekstremne vrednosti, ki smo jih nato iz statistične analize izločili. Porazdelitev podatkov je bila večinoma nesimetrična, zato smo za večino preizkusov uporabili neparametrične teste.

Za primerjavo dveh skupin smo uporabili Mann-Whitneyjev U-test. Za ponazoritev primerjav smo uporabili kvantilni diagram (Box-plot). Referenčne vrednosti smo dobili iz podatkov zdravih preiskovancev, pri čemer je bilo izločenih 2,5 odstotka najnižjih in 2,5 odstotka najvišjih vrednosti koncentracije hepcidina.

S koeficientom variacije po Spearmanu smo ugotavljali, ali obstajajo statistično značilne povezave (korelacije) med posameznimi spremenljivkami. Pri vseh statističnih testih smo izbrali 5-odstotno stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$). Kadar je bila vrednost signifikance večja od 0,05 ($P > 0,05$), smo privzeli ničelno hipotezo, da med parametroma ni statistične razlike. V primeru, da je bila vrednost signifikance manjša od 0,05 ($P > 0,05$), smo zavrnili ničelno hipotezo ter sprejeli alternativno, ki pravi, da med skupinama obstajajo statistične povezave.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČITEV REFERENČNIH VREDNOSTI

V statistično analizo smo vključili 56 zdravih preiskovancev, 29 žensk in 27 moških. Razpon let je bil od 21 do 58, mediana starosti je bila 29 let.

Opisna statistika nekaterih parametrov krvne slike zdravih preiskovancev je skupaj in ločeno za spola prikazana v spodnjih preglednicah II, III in IV.

Preglednica II: Skupna opisna statistika (moški in ženske) nekaterih parametrov krvne slike

SKUPNO	LKCI	ERCI	Hb	HCT	PVE	PHE	KVVE	TRCI
X	6,51	4,81	143	0,43	89	29,8	13,0	236
SD	1,42	0,45	13	0,04	3	1,4	0,8	39
Min	4,40	3,92	118	0,36	82	26,2	11,3	162
Max	11,10	5,66	166	0,50	98	32,6	15,5	383
Me	6,27	4,83	144	0,43	89	29,8	12,9	240
1. kvartil	5,29	4,44	133	0,39	87	29,0	12,5	210
3. kvartil	7,58	5,16	155	0,45	91	30,5	13,3	255

Preglednica III: Opisna statistika nekaterih parametrov krvne slike 29 zdravih žensk

ŽENSKE	LKCI	ERCI	Hb	HCT	PVE	PHE	KVVE	TRCI
X	6,47	4,47	133	0,40	89	29,76	13,18	239
SD	1,40	0,29	8	0,02	3	1,27	0,90	45
Min	4,40	3,92	118	0,36	82	27,30	11,30	162
Max	11,10	4,99	148	0,45	98	29,76	15,50	383
Me	6,40	4,44	134	0,40	89	28,53	12,24	239
1. kvartil	5,30	4,25	127	0,38	88	29,15	12,60	208
3. kvartil	7,20	4,69	139	0,42	91	30,33	13,60	256

Preglednica IV: Opisna statistika nekaterih parametrov krvne slike 27 zdravih moških

MOŠKI	LKCI	ERCI	Hb	HCT	PVE	PHE	KVVE	TRCI
X	6,55	5,18	154	0,46	89	29,77	12,78	234
SD	1,47	0,25	7	0,02	4	1,48	0,62	32
Min	4,60	4,69	138	0,42	82	26,20	11,40	170
Max	9,50	5,66	166	0,50	95	32,20	14,10	293
Me	6,10	5,16	155	0,45	89	29,90	12,90	241
1. kvartil	5,27	4,99	148	0,44	86	29,00	12,40	218
3. kvartil	7,78	5,34	161	0,47	91	31,00	13,20	252

S Shapiro-Wilksovim testom smo preverili, ali je porazdelitev rezultatov koncentracije hepcidina normalna. Ker je bil $p = 0,0041$ in manjši od stopnje tveganja za 5 odstotkov, smo zavrnili ničelno hipotezo in sprejeli alternativno. Porazdelitev rezultatov ni normalna. Iz tega razloga smo za izračun referenčnega intervala izbrali neparametrično percentilno metodo (95-odstotni referenčni interval), kar smo izračunali v statističnem programu MedCalc (poglavje 3.6).

Referenčni interval za koncentracijo hepcidina, določen pri zdravih preiskovancih, je znašal od 1,34 do 11,20 nmol/L.

Preglednica V: Koncentracije hepcidina v serumu zdravih preiskovancev

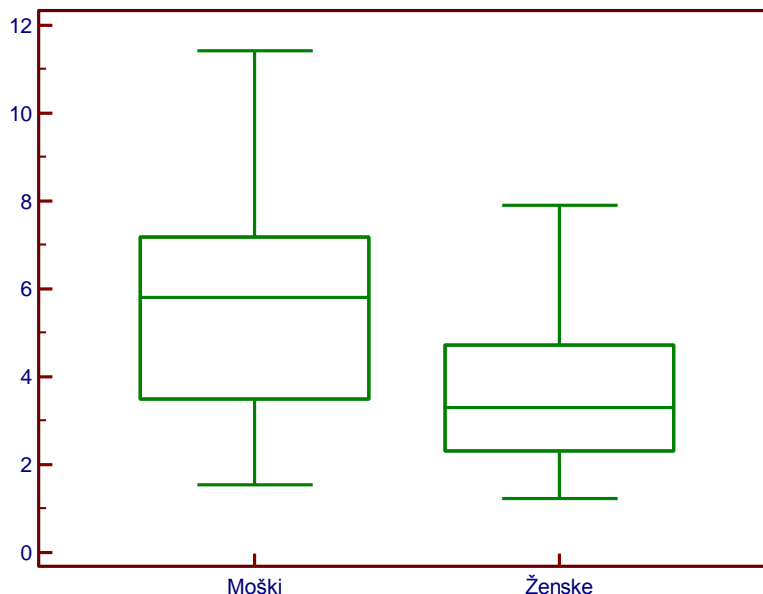
Št. vzorca	Starost	Spol	HEPC (nmol/L)
1	21	M	6,50
2	22	M	5,81
3	23	Ž	3,91
4	25	M	3,25
5	22	Ž	3,75
6	22	M	6,74
7	34	Ž	4,68
8	30	Ž	3,24
9	38	Ž	3,67

10	34	Ž	6,52
11	29	Ž	4,56
12	42	Ž	4,82
13	24	Ž	2,69
14	24	M	1,54
15	42	Ž	2,00
16	29	Ž	1,90
17	53	Ž	5,20
18	28	Ž	2,80
19	25	Ž	2,89
20	43	Ž	1,56
21	25	Ž	1,24
22	23	M	4,68
23	22	Ž	1,61
24	23	Ž	1,48
25	23	Ž	3,46
26	22	Ž	1,64
27	22	M	4,74
28	38	Ž	2,43
29	26	Ž	3,12
30	28	Ž	2,57
31	30	Ž	5,82
32	34	M	3,85
33	52	Ž	7,77
34	41	Ž	4,69
35	24	Ž	3,29
36	53	M	5,63
37	50	Ž	7,66
38	44	M	7,80
39	58	Ž	7,91
40	28	M	6,05
41	31	M	3,39

42	34	M	7,26
43	36	M	11,42
44	56	M	10,83
45	49	M	2,63
46	29	M	5,09
47	54	M	7,62
48	29	M	5,35
49	20	M	3,37
50	61	M	6,41
51	43	M	10,94
52	46	M	10,09
53	22	M	6,37
54	22	M	3,23
55	23	M	2,65
56	24	M	6,95

V statistično analizo za izračun referenčnega intervala za moške smo vključili koncentracije hepcidina (HEPC) pri 27 moških, starih od 20 do 60 let. Mediana starosti je bila 29 let. Referenčne vrednosti smo določili po neparametrični percentilni metodi (95-odstotni referenčni interval). Referenčni interval koncentracije hepcidina za moške je znašal od 1,54 do 11,42 nmol/L.

V statistično analizo za izračun referenčnega intervala hepcidina za ženske smo vključili vrednosti hepcidina 29 žensk, starih od 22 do 58 let. Mediana starosti je bila 29 let. Referenčni interval smo določili po neparametrični percentilni metodi (95-odstotni referenčni interval). Referenčni interval koncentracije hepcidina za ženske je znašal od 1,24 do 7,91 nmol/L.



Slika 10: Grafična primerjava koncentracije hepcidina po spolu zdravih preiskovancev s kvantilnim diagramom (27 moških in 29 žensk)

Z Mann-Whitneyjevim U-testom smo preverili, ali se mediana koncentracije hepcidina po spolu razlikujeta. Ugotovili smo, da je mediana koncentracije hepcidina pri moških statistično pomembno višja (5,81 nmol/L) kot pri ženskah (3,29 nmol/L) ($P < 0,05$) (slika 10).

4.2 DOLOČITEV OBMOČJA LINEARNOSTI ANALIZNE METODE

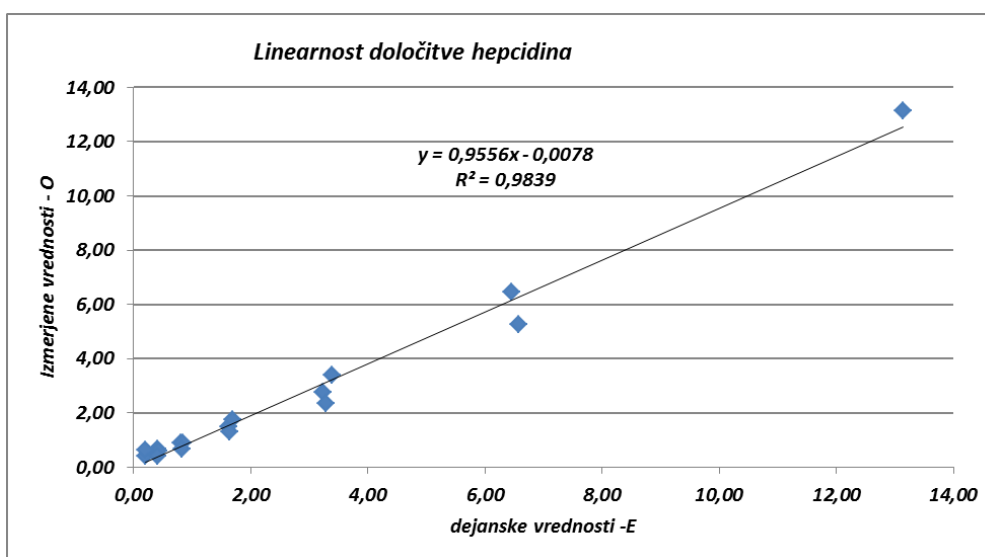
Določitev območja linearnosti metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo napravili, kot je opisano v poglavju 3.3.2.2 Priprava vzorcev za določitev območja linearnosti analizne metode. Dobili smo rezultate, ki so prikazani v preglednici VI.

Preglednica VI: Koncentracije hepcidina treh različnih vzorcev za določitev območja linearnosti metode

Vzorec	Dilucijski faktor	Dejanske vrednosti (E v nmol/L)	Izmerjene vrednosti (O v nmol/L)	O/E (%)
37	1	6,46	6,46	100,00
	2	3,23	2,77	85,90
	4	1,62	1,47	91,13

	8	0,81	0,90	112,00
	16	0,41	0,65	161,06
34	1	3,40	3,40	100,00
	2	1,70	1,74	102,53
	4	0,85	0,87	102,95
	8	0,43	0,58	136,97
1	1	13,14	13,14	100,00
	2	6,57	5,24	79,81
	4	3,29	2,34	71,10
	8	1,64	1,32	80,34
	16	0,82	0,67	82,09
	32	0,41	0,42	101,74

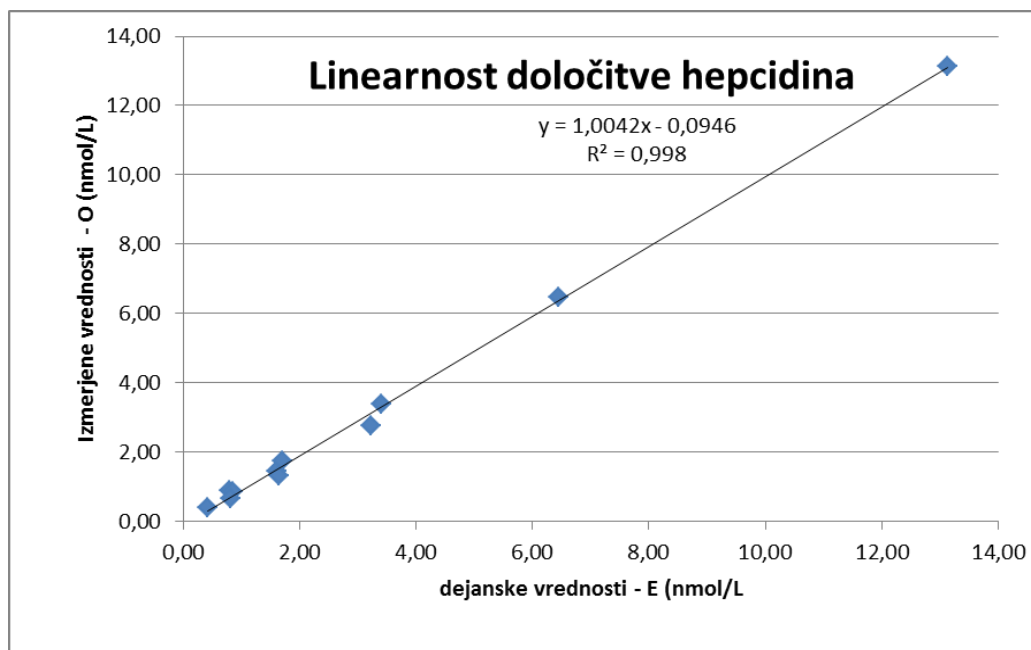
Za lažjo predstavo smo podatke prikazali še z grafom, ki prikazuje ujemanje izmerjene (O) vrednosti z dejansko (E) (slika 11).



Slika 11: Ujemanje izmerjene vrednosti z dejansko.

Test določanja območja linearnosti metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu je pokazal dobro ujemanje med izmerjenimi in dejanskimi vrednostmi. Determinacijski koeficient (R^2) je znašal 0,9839. Pri majhnih koncentracijah hepcidina (pod koncentracijo 0,80 nmol/L) je bilo ujemanje med pričakovano in dejansko vrednostjo slabše. Odstopanje med njima pri dveh testnih vzorcih je bilo večje kot 30 odstotkov. To je bila naša meja sprejemljivosti rezultatov linearnosti.

Iz predstavitve in izračuna rezultatov določanja linearnosti vzorcev v grafu (slika 12) smo rezultate, ki so bili pod vrednostjo 0,80 nmol/L, izključili. Tako smo pri vzorcu številka 37 izključili rezultate pete redčitve (16), pri vzorcu številka 34 četrto redčitev (8) ter pri vzorcu številka 1 tretjo (4) in četrto (8) redčitev. Pri slednji je najverjetneje prišlo do napake pri redčenju oziroma pipetiranju. Nov izračunan determinacijski koeficient je znašal 0,998.



Slika 12: Linearen model določanja območja linearnosti metode brez omenjenih 4 vrednosti.

4.3 DOLOČANJE NATANČNOSTI ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE HEPCIDINA V SERUMU

4.3.1 Določanje ponovljivosti metode v seriji

Določanje ponovljivosti v seriji analizne metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.3.2.3 Priprava vzorcev za določitev natančnosti metode. Dobili smo rezultate, ki so prikazani v preglednici VII.

Preglednica VII: Določitev ponovljivosti določanja koncentracije hepcidina "v seriji" meritev

Št. vzorca	HEPC (nmol/L)	Povpr. vrednost	SD	CV %
1	6,48 6,48 6,28	6,41	0,11	1,77
2	3,26 3,18 3,28	3,24	0,05	1,67
3	2,67 2,85 2,65	2,72	0,11	4,01
4	19,73 20,71 22,02	20,82	1,15	5,52

Povprečna vrednost za prvi vzorec znaša 6,41 nmol/L, SD 0,11 in CV% 1,77 odstotka. Povprečna vrednost za drugi vzorec znaša 3,24 nmol/L, SD 0,05 in CV% 1,67 odstotka. Pri tretjem vzorcu povprečna vrednost znaša 2,72 nmol/L, SD 0,11 in CV% 4,01 odstotka. Pri četrtem vzorcu pa je povprečna vrednost 20,82 nmol/L, SD 1,15 in CV% 5,52 odstotka.

Povprečna vrednost koeficienta variacije (CV %), ki smo ga izračunali kot povprečje vseh štirih koeficientov variacij pri vseh štirih vzorcih, pri določitvi ponovljivosti metode Heparin v seriji znaša 3,24 odstotkov.

4.3.2. Določanje ponovljivosti metode med serijami

Določanje ponovljivosti med serijami analize metode za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.3.2.3 Priprava vzorcev za določitev natančnosti metode. Dobili smo rezultate, ki so prikazani v tabeli VIII.

Preglednica VIII: Koncentracije hepcidina štirih različnih vzorcev, ki so bili narejeni v triplikatu v treh dneh

Št. vzorca	Hepcidin (nmol/L)	Povpr. vrednost	SD	CV %
1	6,48	6,46	0,17	2,72
	6,48			
	6,28			
	5,72			
	6,14			
	6,14			
	7,10			
	7,05			
	6,79			
2	3,26	3,35	0,08	2,35
	3,18			
	3,28			
	3,03			
	3,23			
	3,15			
	3,60			
	3,70			
	3,76			
3	2,67	2,64	0,07	2,64
	2,85			
	2,65			
	2,41			
	2,44			
	2,38			
	2,71			
	2,75			
	2,86			
4	19,73	21,16	1,03	4,89
	20,71			
	22,02			
	19,57			
	21,12			
	19,25			
	21,64			
	23,46			
	22,97			

Povprečna vrednosti prvega vzorca je bila 6,46 nmol/L, SD 0,17 in CV % 2,72 odstotka. Povprečna vrednost drugega vzorca je znašala 3,35 nmol/L, SD 0,08 in CV % 2,35 odstotka. Povprečna vrednost tretjega vzorca je bila 2,64 nmol/L, SD 0,07 in CV % 2,64 odstotka. Povprečna vrednost četrtega vzorca pa je znašala 21,16 nmol/L, SD 1,03 in CV % 4,89 odstotka.

Povprečna vrednost koeficienta variacije, izračunana kot povprečje štirih vrednosti CV za štiri vzorce, pri ponovljivosti med serijami znaša 3,15 odstotka.

4.4 Rezultati koncentracije hepcidina v serumu pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Koncentracijo hepcidina v serumu smo določili 19 bolnikom s sumom na anemijo zaradi pomanjkanja železa. Anemijo zaradi pomanjkanja železa je imelo 16 bolnikov, ki so imeli koncentracijo hemoglobina pod 120 g/L ter znižano koncentracijo feritina pod 20 µg/L. V tej skupini je bilo 14 žensk (88 odstotkov) in 2 moška (12 odstotkov).

Vsem bolnikom smo določili koncentracijo hepcidina (HEPC), koncentracijo eritropoetina (EPO), krvno sliko ter biokemične preiskave v serumu: železo³⁺ (Fe), celotno vezalno sposobnost za železo (TIBC), prosto vezalno sposobnost seruma za železo (UIBC), feritin (FER), C-reaktivni protein (CRP), nasičenje transferina (Sat Tf), topni transferinski receptor (sTrR). Dobljene povprečne vrednosti (X), standardni odklon (SD), minimalna vrednost (min), maksimalna vrednost (max), mediana (Me) ter 1. in 3. kvartil so prikazani v preglednici IX in X.

Preglednica IX: Srednja vrednost (X), standardni odklon (SD), minimalna (min) in maksimalna vrednost (max), mediana (Me) ter 1. in 3. kvartil za starost ter parametri iz diferencialne krvne slike pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

N = 16	Starost	LKC	ERCI	HB	HCT	PVE	PHE	PKHE	PLT	KVVE	RET
	Leta	10*9/L	10*12/L	g/L	L/L	fL	pg	g/L	10*9/L	%	%
X	45	5,63	4,13	98	0,32	78,9	23,9	295	310	16,94	2,74
SD	17	2,19	0,44	17	0,04	8,1	3,6	33	103	2,85	6,89
Min	21	2,52	3,45	60	0,24	67,0	17,3	194	116	13,20	0,50
Max	83	11,98	4,93	116	0,37	95,9	31,8	328	513	23,70	28,50
Me	45	5,32	4,10	101	0,33	77,0	23,5	307	276	16,60	0,94
1. kvartil	33	4,31	3,81	88	0,29	73,0	21,8	283	253	14,70	0,60
3. kvartil	51	6,26	4,43	114	0,36	84,6	27,0	314	365	18,68	1,51

Preglednica X: Opisna statistika števila retikulocitov (ret), vrednosti hemoglobina v retikulocitih (Ret hem), delež hipokromnih eritrocitov (Hipo erci), Fe, UIBC, TIBC, sTrR, FER, sTrR, CRP ter HEPC in EPO pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa.

N = 16	Ret	Ret hem	Hipo erci	Fe (III)	UIBC	TIBC	SAT Tf	FER	sTrR	CRP	HEPC	EPO
	10 ⁹ /L	pg	%	μmol/L	μmol/L	μmol/L	%	μg/L	mg/L	mg/L	nmol/L	U/mL
X	41,70	23,25	14,0	5,9	69,5	75,4	8	6	3,78		1,36	58,0
SD	20,64	5,33	17,0	4,1	11,0	11,0	5	3	2,21		0,46	57,9
Min	19,60	13,70	0,4	1,6	48,2	55,3	2	<3	1,48	<5	0,77	6,9
Max	104,20	31,80	60,4	15,8	84,4	95,6	28	11	9,24	10,00	2,77	228,1
Me	35,70	23,65	6,3	4,0	71,5	75,9	6	5	3,00		1,26	41,4
1. kvartil	28,53	18,38	2,8	2,7	64,6	71,4	4	4	2,19		1,05	15,6
3. kvartil	48,10	27,93	19,7	7,9	78,8	75,9	12	9	5,09		1,57	75,9

4.5 Rezultati koncentracije hepcidina bolnikov s kronično ledvično boleznijo

Koncentracijo hepcidina v serumu smo določili 24 bolnikom s kronično ledvično boleznijo. V preiskavo smo vključili 14 (58 %) moških in 10 (42 %) žensk, ki so bili v dopoldanskem času na Oddelku za nefrologijo Kliničnega centra, Oddelek za dializo naročeni na dializo. Bolnikom smo določili koncentracijo HEPC, EPO, krvno sliko in biokemične preiskave v serumu: Fe, TIBC, UIBC, FER, CRP, Sat Tf, sTrR. Dobljene povprečne vrednosti, standardni odklon (SD), minimalna vrednost (min), maksimalna vrednost (max), mediana (Me) ter 1. in 3. kvartil so prikazani v preglednicah XI in XII.

Preglednica XI: Opisna statistika za starost ter parametri iz diferencialne krvne slike pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo

N = 24	Starost	LKCI	ERCI	Hb	HCT	PVE	PHE	PKHE	TRCI	KVVE	RET	RET
	Leta	10 ⁹ /L	10 ¹² /L	g/L	L/L	fL	pg	g/L	10 ⁹ /L	%	%	10 ⁹ /L
X	63	6,79	3,53	108	0,34	96,1	30,7	320	189	14,9	1,5	53
SD	12	2,86	0,47	16	0,04	5,0	1,4	11	90,50	1,7	0,6	18,73
Min	45	2,84	2,55	76	0,24	89,9	28,9	285	68,0	12,3	0,8	29,0
Max	86	15,62	4,73	152	0,45	109,4	33,4	341	512,0	20,0	3,2	115,5

Me	63	6,57	3,60	111	0,34	94,7	30,4	320	164,0	14,6	1,4	50,1
1. kvartil	54	4,68	3,21	96	0,30	92,6	29,5	316	141,0	13,7	1,2	39,5
3. kvartil	73	8,05	3,79	118	0,37	99,7	31,9	329	206,5	15,6	1,8	58,5

Preglednica XII: Opisna statistika za Hipo Erci, Ret Hb, Fe³⁺, UIBC, TIBC, Sat Tf, FER, HEPC, EPO ter sTrR pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo

N = 24	Hipo	ret Hb	Fe(III)	UIBC	TIBC	SAT	FER	CRP	HEPC	EPO	sTrR
	ERCI	pg	μmol/L	μmol/L	μmol/L	TRF	μg/L	mg/L	nmol/L	U/mL	mg/L
	%	pg	μmol/L	μmol/L	μmol/L	%	μg/L	mg/L	nmol/L	U/mL	mg/L
X	1	31	10	33	43	22	429		26,64	17	1,41
SD	2,1	2,4	4	6,53	6,59	8	344		14,64	23	0,50
Min	0,1	25,50	0,9	21,4	33,10	3,0	9	< 5	3,94	1,9	0,7
Max	10,6	33,80	15,7	52,2	60,00	42,0	1212	180,0	44,44	100,0	3,0
Me	0,5	30,85	9,3	31,8	42,00	24,0	294		26,47	10,2	1,36
1. kvartil	0,3	29,4	7,2	29,3	37,9	16,6	125		12,26	4,6	1,14
3. kvartil	0,8	33,1	12,6	37,8	47,1	27,0	707		43,68	16,5	1,51

4.6 Povezanost (korelacija) koncentracije hepcidina s parametri za oceno stanja zalog železa in učinkovite eritropoeze

V statističnem programu MedCalc smo izračunali, kako so posamezni parametri za oceno stanja zalog železa in učinkovite eritropoeze povezani s koncentracijo hepcidina. Korelacijo smo izračunali po postopku, opisanem v poglavju 3.6 Statistično vrednotenje rezultatov. Uporabili smo rezultate obeh skupin bolnikov, tako bolnike s sideropenično anemijo kot tiste z anemijo zaradi kronične bolezni. Na skupno 40 preiskovancih smo preverili povezavo hepcidina s parametri za oceno stanja zalog Fe. Dobili smo rezultate, ki so prikazani v preglednicah XIII in XIV.

Preglednica XIII: Korelacije HEPC s fer, EPO, Hct, Hb, Hypo Erci, PHE, PVE in KVVE

		FER	EPO	HCT	Hb	HYPO ERCI	PHE	PHKE	PVE	KVVE
HEPCIDIN	Spearmanov koeficient kor	0.893	-0.487	0.078	0.198	-0.548	0.761	0.475	0.710	-0.327
	(RHO) Significanca P	< 0.0001	0.0014	0.6313	0.2204	0.0002	< 0.0001	0.0020	< 0.0001	0.0397
	Število vzorcev	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Preglednica XIV: Korelacije HEPC z Ret, Ret Hb, Sat Tf, TIBC, UIBC Fe in feritinskim indeksom (Fer indeks)

		RET %	RET 109/L	RET Hb	SAT Tf	TIBC	sTRt	UIBC	Fe III	Fer indeks
HEPCIDIN	Spearmanov koeficient korelacije	0.412	0.393	0.619	0.665	-0.767	-0.652	-0.754	0.466	-0,469
	(RHO) Significanca P	0.0083	0.0122	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0024	0,0023
	Število vzorcev	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Povezav med hepcidinom in hematokritom ter hepcidinom in hemoglobinom nismo našli, saj je bil Spearmanov koeficient korelacije $RHO > 0,05$.

Med vsemi drugimi parametri pa smo dokazali, da obstaja statistična povezava, saj je bil Spearmanov koeficient korelacije $RHO < 0,05$.

Močno povezavo smo našli med hepcidinom in feritinom, med hepcidinom in MCH (povprečna količina hemoglobina v eritrocitih), med hepcidinom in MCV (povprečni volumen eritrocitov) ter med hepcidinom in UIBC (prosta vezalna sposobnost seruma za železo).

Močno negativno povezavo pa smo našli med hepcidinom in TIBC (celotna vezalna sposobnost seruma za železo).

Srednjo povezanost smo našli med hepcidinom in MCHC (povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih), hepcidinom in odstotkom retikulocitov (Ret %), med hepcidinom in hemoglobinom v retikulocitih (Ret Hem), hepcidinom in nasičenostjo transferina (Sat Trf) ter med hepcidinom in železom III. Med hepcidinom in topnim transferinskim receptorjem (sTrR), med hepcidinom in eritropoetinom (EPO), med hepcidinom in deležem hipokromnih eritrocitov (Hipo He) ter med hepcidinom in feritinskim indeksom pa smo našli srednjo negativno povezavo.

Šibko povezavo smo našli med hepcidinom in številom retikulocitov ter nizko negativno povezavo med hepcidinom in koeficientom variacije volumna eritrocitov (RDW CV).

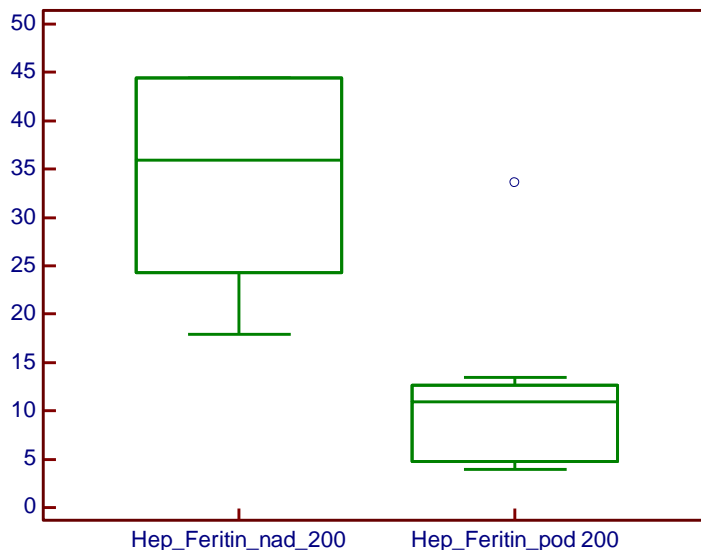
4.7 Razlike v koncentraciji hepcidina glede na parametre

Z Mann-Whitneyjevim testom smo preverili, ali prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo vsebnost hemoglobina v retikulocitih pod 30 pg, in tistimi, ki imajo nad 30 pg. Ugotovili smo, da ne prihaja do statistično pomembnih razlik ($P = 0,7993$, Mann-Whitneyjev test).

Prav tako smo ugotovili, da ne prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo CRP pod, in tistimi nad 5mg/L, saj je bil P večji od 0,05 ($P = 0,6427$, Mann-Whitneyjev test).

Preverili smo tudi, ali so statistično pomembne razlike v koncentraciji hepcidina pri bolnikih z nasičenostjo transferina pod in nad 20 %, vendar tudi nismo dokazali statistične razlike ($P = 0.3103$, Mann-Whitneyjev test).

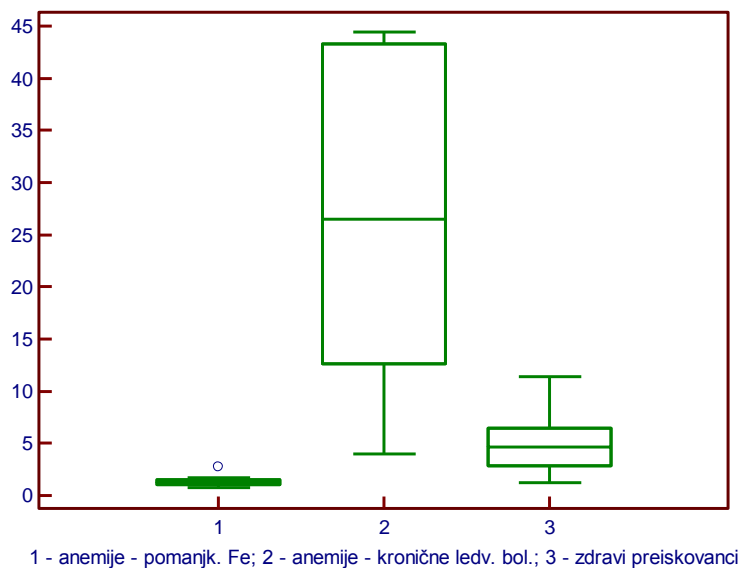
Do statistično pomembnih razlik prihaja v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo koncentracijo feritina v serumu pod 200 $\mu\text{g/L}$, v primerjavi s tistimi, ki ga imajo nad 200 $\mu\text{g/L}$ ($P = 0,006$, Mann-Whitneyjev test) (slika 13).



Slika 13: Grafična primerjava koncentracije hepcidina bolnikov, ki imajo koncentracijo feritina v serumu nad 200 $\mu\text{g/L}$ (16 preiskovancev) s tistimi, ki imajo koncentracijo feritina pod 200 $\mu\text{g/L}$ (8 preiskovancev), s kvantilnim diagramom

4.8 Primerjava koncentracije hepcidina med zdravimi, bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolniki z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni

Z Mann-Whitneyjevim testom smo preverili, ali prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri treh različnih populacijah: pri zdravih preiskovancih, bolnikih z anemijo zaradi znižanega železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni. Dokazali smo, da med vsemi tremi skupinami prihaja do statistično pomembnih razlik. Ko smo primerjali koncentracije hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa ter pri zdravi populaciji, je bil P manjši od 0,05 ($P = 0,0001$, Mann-Whitneyjev test). Pri primerjavi koncentracije hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične odpovedi in pri zdravih preiskovancih je bila vrednost $P = 0,001$ (Mann-Whitneyjev test). Prav tako je bil $P = 0,0001$ (Mann-Whitneyjev test) pri primerjavi koncentracij hepcidina bolnikov z anemijo zaradi pomanjkanja železa ter bolnikov z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni (slika 14).



Slika 14: Grafična primerjava koncentracij hepcidina v serumu pri bolnikih, ki imajo 1 – anemijo zaradi pomanjkanja železa (16 preiskovancev), 2 – anemijo zaradi kronične ledvične bolezni (24 preiskovancev), in 3 – pri zdravih preiskovancih (56 preiskovancev).

5 RAZPRAVA

Analizno metodo za določanje koncentracije hepcidina v serumu smo delno validirali. Metodi smo določili natančnost in območje linearnosti. Linearnost smo določili od najvišje koncentracije 13,14 nmol/L do 0,42 nmol/L. Test linearnosti je pokazal dobro ujemanje med izmerjenimi in dejanskimi vrednostmi. Determinacijski koeficient (R^2) je znašal 0,9839. Pri majhnih koncentracijah hepcidina (pod 0,80 nmol/L) pa je bilo ujemanje med pričakovano in dejansko vrednostjo slabše. Odstopanje med njima je bilo pri dveh testnih vzorcih večje od 30 odstotkov. To je bila naša meja sprejemljivosti rezultatov linearnosti.

Določili smo tudi natančnost metode "v seriji" (within-run) in "med serijami" (between-run). Vrednost koeficienta variacije (CV %) pri določitvi ponovljivosti metode določanja koncentracije hepcidina "v seriji" znaša 3,24 odstotka, kar je primerljivo s podatki proizvajalca (CV v seriji 5,1 odstotka).

Povprečna vrednost koeficienta variacije pri ponovljivosti "med serijami" znaša 3,15 odstotka, po podatkih proizvajalca pa so te vrednosti višje (CV med serijami 12,7 odstotka).

Za izračun referenčnih vrednosti smo uporabili vrednosti 56 zdravih preiskovancev ter dobili referenčne vrednosti hepcidina **(1,34 do 11, 20) nmol/L**. V navodilih proizvajalca je naveden referenčni interval od 0,36 do 14,08 nmol/L. Njihov širši interval lahko pojasnimo s tem, da so izvajali testiranje na populaciji Nemcev, ki se seveda lahko razlikuje od populacije Slovencev. Smiselno je, da smo postavili svoje referenčne vrednosti in se jih zaradi različne populacije tudi držimo.

Glede na to, da se vrednosti železa in hepcidina razlikujejo med moškimi in ženskami, smo izračunali referenčne vrednosti posebej za moške in ženske ter tudi na ta način preverili analizno metodo hepcidin.

Hepcidin moški = (1,54–11,42) nmol/L

Hepcidin ženske = (1,24–7,91) nmol/L

Ugotovili smo, da je mediana koncentracije hepcidina pri moških statistično pomembno višja (5,81 nmol/L) kot pri ženskah (3,29 nmol/L) ($P < 0,05$, Mann-Whitneyjev test). S tem smo ponovno dokazali, da je naša analizna metoda dobra, saj je bilo razliko tudi pričakovati. V rutinski praksi bomo sicer zaenkrat uporabljali referenčne vrednosti, ki smo jih dobili skupno, saj imamo premajhno populacijo zdravih moških in zdravih žensk.

Vemo, da tudi spolni hormoni vplivajo na koncentracijo hepcidina, ravno tako cirkadiani ritem. Ženske imajo nižje vrednosti kot moški, po menopavzi pa se jim koncentracija zviša. Koncentracije hepcidina dopoldan so nižje od popoldanskih. Mi tega nismo preverili, saj smo imeli premajhno skupino, so pa v študiji T. E. Galesloot in sod. (18) to potrdili. Vsem preiskovancem, tako zdravim kot tudi bolnikom z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolnikom z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni, smo odvzeli kri za določanje hepcidina v dopoldanskem času. Zato se tega držimo tudi naprej pri rutinski praksi v laboratoriju in definiramo čas odvzema krvi za določanje koncentracije hepcidina v serumu v standardni operativni postopek (SOP).

Preverili smo, ali prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri treh različnih populacijah: pri zdravih preiskovancih, bolnikih z anemijo zaradi znižanega železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni. Dokazali smo, da med vsemi tremi skupinami prihaja do statistično pomembnih razlik, kar smo tudi pričakovali. Bolniki s kroničnimi ledvičnimi boleznimi imajo mediano koncentracije hepcidina visoko ($Me = 26,46$ nmol/L) nad zgornjo referenčno mejo. To je v skladu s pričakovanji. Heparin se pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo iz ledvic ne more izločiti in je zato tako povečan. Marsikateri bolnik s kronično ledvično boleznijo ima kljub zdravljenju z eritropoetinom, pripravki železa in stimulatorjem eritropoeze še vedno znižano eritropoezo. Najverjetneje je razlog ravno tako visok hepcidin, ki zavira absorpcijo železa. Za zdravljenje te anemije bi bilo smiselno razmišljati v smeri antidota hepcidina oziroma antagonistov hepcidina.

Bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa imajo serumske koncentracije hepcidina zmanjšane ($Me = 1,26$), kar je pod referenčnim območjem. To smo pričakovali, saj imajo funkcionalno pomanjkanje železa, zato je tudi hepcidin nizek.

V našem primeru se koncentracija hepcidina lepo izključuje pri teh treh skupinah preiskovancev. Problemi pa nastanejo pri ločevanju anemije zaradi kronične bolezni

(ACD), anemije zaradi pomanjkanja železa (IDA) in kombinirane anemije ACD/IDA. V praksi se uporablja tudi Thomasov plot, ki ločuje te anemije na osnovi feritinskega indeksa in koncentracije hemoglobina v retikulocitih.

Preverili smo tudi povezave koncentracije hepcidina s parametri, ki se v klinični praksi uporabljajo za oceno stanja zalog železa in učinkovitosti eritropoeze.

Najmočnejšo pozitivno povezavo smo našli med hepcidinom in feritinom, kar se sklada s podatki iz literature (18). Močno povezavo smo dokazali med hepcidinom in PHE (povprečna količina hemoglobina v eritrocitih), med hepcidinom in PVE (povprečni volumen eritrocitov) ter med hepcidinom in UIBC (prosta vezalna sposobnost seruma za železo). To pomeni, da bo ob večji koncentraciji hepcidina v krvi zaznati tudi večji feritin, PHE, PVE, UIBC.

Močno negativno povezavo pa smo našli med hepcidinom in TIBC (celotna vezalna sposobnost seruma za železo). Navedeno se sklada s podatki iz literature in dejstvom, da hepcidin znižuje koncentracijo železa, sposobnost seruma za vezavo železa pa se poveča, če imamo primankljaj železa.

Srednjo pozitivno povezanost smo našli med hepcidinom in PKHE (povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih), hepcidinom in odstotkom retikulocitov (Ret %), med hepcidinom in hemoglobinom v retikulocitih (Ret Hb), hepcidinom in nasičenostjo transferina (Sat Tf) ter med hepcidinom in železom.

Med hepcidinom in topnim transferinskim receptorjem (sTrR), med hepcidinom in eritropoetinom (EPO), med hepcidinom in deležem hipokromnih eritrocitov (Hipo Erci) ter med hepcidinom in feritinskim indeksom smo našli srednjo negativno povezavo, torej so obratno povezani – ob visokem hepcidinu bodo ti parametri nizki.

Nizko povezavo smo našli med hepcidinom in številom retikulocitov ter nizko negativno povezavo med hepcidinom in koeficientom variacije volumna eritrocitov (KVVE).

Preverili smo tudi, ali prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo vsebnost hemoglobina v retikulocitih pod 30, in tistimi, ki imajo nad 30 pg. Ugotovili smo, da ne prihaja do statistično pomembnih razlik ($P = 0,7993$, Mann-Whitneyjev test).

Prav tako smo ugotovili, da ne prihaja do statistično pomembnih razlik v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo CRP pod, in tistimi nad 5mg/L, saj je bil P večji od 0,05 ($P = 0,6427$, Mann-Whitneyjev test).

Preverili smo tudi, ali so statistično pomembne razlike v koncentraciji hepcidina pri bolnikih z nasičenostjo transferina pod in nad 20 %, vendar tudi nismo dokazali statistične razlike ($P = 0.3103$, Mann-Whitneyjev test).

Do statistično pomembnih razlik pa prihaja v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo feritin pod 200, v primerjavi s tistimi, ki ga imajo nad 200 μ g/L ($P = 0,006$, Mann-Whitneyjev test). Navedeno je v skladu s pričakovanji, saj sta hepcidin in feritin najmočnejše povezana.

6 SKLEPI

V magistrski nalogi smo delno validirali analizno metodo za določanje koncentracije hepcidina v serumu. Preiskavo zaključujemo s sklepi:

- Dokazali smo, da je metoda primerna za določanje koncentracije hepcidina v serumu. Linearnost in ponovljivost metode sta primerljivi s podatki proizvajalca. Tako smo preiskavo lahko vpeljali v rutinsko prakso.
- Določili smo lastne referenčne vrednosti za oba spola skupaj, a bi jih bilo smiselno ločiti po spolu na večji skupini zdravih preiskovancev.
- Koncentracija hepcidina je v primerjavi s skupino zdravih preiskovancev statistično značilno znižana pri bolnikih s sideropenično anemijo in povišana pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo.
- Koncentracija hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in bolnikih z anemijo zaradi kronične ledvične bolezni močno pozitivno korelira s koncentracijo feritina, kar je v skladu s podatki iz literature.
- Koncentracija hepcidina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in anemijo zaradi kronične ledvične bolezni je statistično značilno povezana tudi s koncentracijo Fe, sTfR, fer indeksom, sat Tf, TIBC, Hct, PVE, PHE, PKHE, Hipo Erci, Ret %, Ret in Hb ret.
- Do statistično pomembnih razlik prihaja v koncentraciji hepcidina pri bolnikih, ki imajo koncentracijo feritin v serumu pod 200, v primerjavi s tistimi, ki ga imajo nad 200 μ g/L.

7 LITERATURA

- (1) Pretnar J: Bolezni krvotvornih matičnih celic. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4.izdaja, Littera picta, 2011: 1243-1290.
- (2) Šuput D, Bunc M: Anemije. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije. 3. izdaja, Ljubljana, Inštitut za patološko fiziologijo, 2002: 15-17.
- (3) Steinbicker A U, Muckenthaler M U: Out of balance-Systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients* 2013; 5: 3034-3061.
- (4) Anderson E R, Shah Y M: Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol* 2013; 3: 315-330.
- (5) Worwood M, May A: Iron deficiency anemia and iron overload. Bain B J, Bates I, Laffan A M, Lewis S M: Dacie and Lewis: Practical heamatology. 11. izdaja, Elsevier 2012: 176-196.
- (6) Ganz T, Nemeth E: Iron Metabolism: interactions with normal and disordered eritropoiesis. *Cold spring harb perspect med* 2012; 2: 1-10.
- (7) Ganz T, Nemeth E: Hepcidin and iron homeostasis. *Biomedica et biophysica acta* 2012; 1823: 1434-1443.
- (8) Ruchala P, Nemeth E: The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends in Pharmacological Science* 2014; 35: 155-161.
- (9) Dallalio G, Fleury T, Means R T: Serum hepcidin in clinical specimens. *British journal of Haematology* 2003; 122: 996-1000.
- (10) Goyal J, McCleskey B, Adamski J: Peering into the future: Hepcidin testing. *American Journal of Hematology*, junij 2013, 88: 976-978.

- (11) Sun C C, Vaja V, Babitt J L, Lin H Y: Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *American Journal of Hematology* 2012; 88: 976-978.
- (12) Zipperer E, Post J G, Herket M, Kündgen A, Fox F, Haas R, Gattermann N, Germing U: Serum hepcidin measured with an improved ELISA correlates with parameters of iron metabolism in patient with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 2013; 92: 1617-1623.
- (13) Princip testa hepcidin
<http://www.epitomics.com/products/portals/peg>. Abcam, Dostopano 28.4.14
- (14) D'Angelo G: Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. *Blood Research* 2013; 48: 10-15.
- (15) Punnonen K, Irjala K and Rajarnäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052-1057.
- (16) Thomas C and Thomas L.: Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clinical Chemistry* 2002; 48:1066-1076.
- (17) Hoffbrand A V, Hershko C, Camascella C: Iron metabolism, iron deficiency and disorders of hem synthesis. Hoffbrand A V, Catovsky D, Tuddenham E G T, Green A: *Postgraduate haematology*. 6. izdaja, Wiley-Blackwell, London, 2011: 26-59
- (18) Galesloot T E, Vermeulen S H, Geurts-Moespot A J, Klaver S M, Kroot J J, van Tienoven D, Wetzels J F M, Kiemeny L A L M, Sweep F C, den Heijer M, Swinkels D W: Serum hepcidin: Reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011; 117: 218-225