

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA JARC

UPORABNOST ERITROCITNIH IN RETIKULOCITNIH PARAMETROV  
PRI OPREDELITVI ANEMIJE

MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA JARC

UPORABNOST ERITROCITNIH IN RETIKULOCITNIH PARAMETROV  
PRI OPREDELITVI ANEMIJE

APPLICATION OF ERYTHROCYTE AND RETICULOCYTE INDEXES  
IN DEFINING ANEMIA

MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju, Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ.dipl.inž.kem.inž., spec.med.biokem. in somentorstvom doc. dr. Irene Preložnik Zupan, dr. med.. Meritve biokemijskih parametrov in krvno sliko na analizatorju Advia so naredili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana.

Zahvalila bi se rada mentorici doc. dr. Heleni Podgornik in somentorici doc. dr. Ireni Preložnik Zupan. Iskrena hvala za vse nasvete in velikodušno pomoč pri nastajanju magistrske naloge ter za vse prijazne besede in napotke, ki mi bodo ostali vtisnjeni v spomin vse življenje. Zahvaljujem se tudi mag. Nadi Snoj, spec.med.biokem., Urgentnemu laboratoriju (UIKIKKB), za opravljene analize na Adviji. Zahvala gre tudi profesorjem in drugim zaposlenim Fakultete za farmacijo, za vsa predana znanja in spodbude v času šolanja. Zahvaliti se želim tudi svoji družini, ker so mi omogočili študij in me podpirali pri mojem delu.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ.dipl.inž.kem.inž., spec.med.biokem. in somentorstvom doc. dr. Irene Preložnik Zupan, dr. med..

**KAZALO**

1	UVOD .....	1
1.1	Definicija anemije in klinična slika .....	1
1.1.1	Pica in pagofagija .....	1
1.2	Vzroki nastanka in razvrstitev anemij .....	2
1.3	Sideropenična anemija .....	3
1.3.1	Zgodovinski pregled .....	3
1.3.2	Metabolizem železa .....	4
1.3.3	Pojavnost sideropenične anemije .....	4
1.4	Anemije pri kroničnih boleznih/vnetju .....	5
1.5	Laboratorijska diagnostika sideropenične anemije in anemije pri kroničnih boleznih.....	6
1.5.1	Laboratorijska diagnostika pomanjkanja železa v telesu .....	7
1.6	Vloga hemoglobina v retikulocitih ter deleža hipohromnih eritrocitov pri opredelitvi anemije .....	8
1.6.1	Vpeljava merjenja količine hemoglobina v retikulocitih v diagnostiko anemij .....	9
1.6.2	Primerjava parametrov za oceno količine hemoglobina v retikulocitih .....	9
1.7	Ugotavljanje funkcijskega pomanjkanja železa pri sideropenični anemiji.....	9
1.7.1	Funkcijsko pomanjkanja železa pri kronični ledvični bolezni .....	10
1.8	Uporabnost določanja deleža hipohromnih eritrocitov za oceno aktivnosti eritropoeze .....	11
1.9	. Vplivi bioloških in analitskih dejavnikov na količino hemoglobina v retikulocitih in delež hipohromnih eritrocitov.....	13
1.10	Določanje deleža nezrelih retikulocitov.....	13
2	NAMEN DELA.....	15
3	MATERIALI IN METODE .....	17
3.1	Zbiranje vzorcev .....	17
3.2	Določanje eritrocitnih in retikulocitnih parametrov .....	17
3.2.1	Hematološki analizator Sysmex-XN 1000 .....	17
3.2.2	Način določanja parametrov .....	18
3.2.3	Hematološki analizator Advia 120 .....	19
3.3	Reagenti in kontrole.....	20

3.4	Statistična obdelava podatkov .....	22
4	REZULTATI.....	24
4.1	Raziskovalne skupine s kriteriji.....	24
4.2	Porazdelitev podatkov.....	24
4.3	Korelacija med retikulocitnima parametroma ocene količine hemoglobina v retikulocitih.....	25
4.4	Korelacija med eritrocitnima parametroma ocene deleža hipohromnih eritrocitov . .....	27
4.5	Eritrocitni in retikulocitni parametri po posameznih skupinah .....	29
4.5.1	Delež nezrelih retikulocitov.....	29
4.5.2	Količina hemoglobina v retikulocitih.....	29
4.5.3	Delež hipohromnih eritrocitov.....	30
4.6	Primerjava parametrov med testnimi skupinami .....	31
4.7	Določanje mejnih vrednosti eritrocitnih in retikulocitnih parametrov pri sideropenični anemiji in anemiji zaradi kronične ledvične bolezni.....	34
5	RAZPRAVA .....	36
5.1	Določitev referenčnih intervalov za količino hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov .....	36
5.2	Primerjava dveh načinov določanja količine hemoglobina v retikulocitih.....	37
5.3	Primerjava dveh načinov določanja deleža hipohromnih eritrocitov .....	38
5.4	Določitev referenčnega intervala za delež nezrelih retikulocitov.....	39
5.5	Značilnosti količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri bolnikih z anemijo .....	39
5.6	Mejne vrednosti ocene količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri diagnosticiranju pomanjkanja železa .....	41
5.7	Mejne vrednosti ocene količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri spremljanju bolnikov s kronično ledvično odpovedjo .....	42
6	ZAKLJUČEK.....	45
7	LITERATURA.....	46

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reagenti za analizator Sysmex XN-1000 (42).....	21
Preglednica II: Vrednosti IRF po raziskovalnih skupinah.....	29
Preglednica III: Vrednosti RET-He in CHr po raziskovalnih skupinah.....	30

Preglednica IV: Vrednosti HYPO-He in %HYPO po raziskovalnih skupinah.....	30
Preglednica V: Mejne vrednosti RET-He in CHr pri bolnikih z anemijo .....	34
Preglednica VI: Mejne vrednosti HYPO-He in %HYPO pri bolnikih z anemijo .....	35
Preglednica VII: Povprečne vrednosti retikulocitnih in eritrocitnih parametrov pri skupinah preiskovancev v primerjavi z literaturnimi podatki (30) .....	40
Preglednica VIII: Mejne vrednosti parametrov v literaturi (32).....	43
Preglednica IX: Referenčne vrednosti Specializiranega hematološkega laboratorija.....	51
Preglednica X: Demografski podatki in rezultati meritev za vse preiskovane vzorce. ....	52

## KAZALO SLIK

Slika 1: Značilni razsevni diagram eritrocitnega kanala .....	19
Slika 2: Značilen razsevni diagram retikulocitnega kanala .....	19
Slika 3: Korelacija RET-He in CHr. Vsi vzorci (N = 186). .....	25
Slika 4: Bland-Altmanov diagram RET-He in CHr. Vsi vzorci (N = 186). .....	25
Slika 5: Korelacija RET-He in CHr. Zdrave osebe (N = 58). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram. ....	26
Slika 6: Korelacija RET-He in CHr. Bolniki s SDA (N = 25). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram. ....	26
Slika 7: Korelacija RET-He in CHr. Bolniki s CKD 1, 2 (N = 57). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram. ....	27
Slika 8: Korelacija HYPO-He in %HYPO. Vsi vzorci (N = 186).....	27
Slika 9: Linearna povezava med HYPO-He* in %HYPO. Vsi vzorci (N = 186). ....	28
Slika 10: Linearna povezava med HYPO-He* in %HYPO. A) Zdrave osebe (N = 58). B) Bolniki s SDA (N = 25). ....	28
Slika 11: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s SDA in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.....	31
Slika 12: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s CKD1,2 in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.....	32
Slika 13: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s CKD 3 in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.....	32
Slika 14: Porazdelitev vrednosti parametra IRF pri bolnikih in zdravih (test Mann-Whitney). A) SDA. B) CKD. ....	33
Slika 15: ROC krivulji RET-He in CHr pri skupini s SDA. ....	35
Slika 16: ROC krivulji HYPO-He in %HYPO pri skupini s SDA.....	35

## POVZETEK

Anemija je stanje, ki povzroči nezadostno oksigenacijo perifernih tkiv zaradi zmanjšane mase eritrocitov v krvi. Če razvrstimo anemije glede na vzrok nastanka, ločimo anemije zaradi pomanjkljivega nastajanja ali povečanega razpada eritrocitov. Sideropenična anemija nastane zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov ob povečanih potrebah po železu. Najpogostejši vzrok pomanjkanja železa v telesu so močne menstrualne krvavitve, razjede na prebavilih in kronične vnetne bolezni črevesa. Anemije ob kroničnih boleznih/vnetjih nastanejo zaradi oviranega prenosa železa v kri, kljub njegovi normalni ali povečani koncentraciji. Vnetje sproži aktivacijo hepcidina, jetrnega proteina, ki zavira prenos železa iz zalog makrofagov in absorpcijo železa v tankem črevesu. Posebna oblika anemije ob kroničnem vnetju je anemija pri kronični ledvični odpovedi. Laboratorijska diagnostika anemije ob kroničnih boleznih in sideropenične anemije obsega krvno sliko in biokemijske meritve. Z razvojem hematoloških analizatorjev so se na trgu pojavili novi eritrocitni in retikulocitni parametri, s katerimi lahko opredelimo učinkovitost eritropoeze v obdobju 120 dni in določimo trenutno oceno vgradnje železa v hemoglobin. Namen magistrske naloge je bil opredeliti uporabnost eritrocitnih in retikulocitnih parametrov pri oceni eritropoeze. Osredotočili smo se na parametre, s katerimi ocenjujemo količino hemoglobina v retikulocitih (RET-He, CHr), delež nezrelih retikulocitov (IRF) in delež hipohromnih eritrocitov (HYPO-He, %HYPO). Navedene parametre smo določili skupaj s celotno krvno sliko pri zdravih osebah, bolnikih s sideropenično anemijo in bolnikih s kronično ledvično odpovedjo. Ugotovili smo zelo dobro korelacijo med parametroma RET-He in CHr, ki je linearna ( $r = 0,895$ ). Med parametroma HYPO-He in %HYPO smo potrdili polinomsko povezavo drugega reda in s transformacijo HYPO-He\* ugotovili linearno povezavo med HYPO-He\* in %HYPO. Diagnostična uporabnost RET-He in HYPO-He pri oceni pomanjkanja železa je boljša v primerjavi s CHr in %HYPO. Pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo prisotnost akutnega vnetja ( $CRP > 5$  mg/L) ni vplivala na meritve raziskovalnih parametrov. Zaključimo lahko, da so parametri, ki smo jih preverjali v magistrskem delu, ne glede na način določanja, uporabni pri oceni aktivnosti eritropoeze in v veliko pomoč zdravnikom pri opredelitvi anemije.

**Ključne besede:** Anemija, ocena eritropoeze, eritrocitni in retikulocitni parametri, korelacija, diagnostična uporabnost.

## ABSTRACT

Anemia is defined as a decrease in the mass of red blood cells, which induces impaired oxygen transport to peripheral tissues. We classify anemias depending on the cause; anemias caused either by an impaired production or by loss /destruction of red blood cells. Iron deficiency anemia develops when a lack of iron in the body leads to impaired production of erythrocytes. The most common causes of iron deficiency are heavy menstruation, peptic ulcer disease and inflammatory bowel disease. Anemias of inflammatory and chronic diseases (anemia of chronic kidney disease) interfere with the body's ability to use iron from stores and absorb it from the diet. Furthermore, they induce the expression of hepcidin, a liver-produced protein, which in turn acts as a negative regulator of intestinal iron absorption and macrophage iron release. The laboratory evaluation of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia consists of a complete blood count and determination of particular biochemical parameters. Since the development of automated blood cell counters erythrocyte and reticulocyte parameters are being used to estimate the degree of effective erythropoiesis over the preceding 120 days and to assess the incorporation of iron into hemoglobin. The purpose of this thesis was to evaluate erythrocyte and reticulocyte parameters in assessment of erythropoietic activity. The parameters studied were reticulocyte hemoglobin content (RET-He, CHr), percentage of immature reticulocytes (IRF) and percentage of hypochromic red cells (HYPO-He, %HYPO). Parameters were determined with complete blood counts in healthy individuals, patients with iron deficiency anemia and patients with chronic kidney disease. We found a very good linear correlation ( $r = 0,895$ ) between RET-He and CHr parameters. We have confirmed a second-degree polynomial correlation between HYPO-He and %HYPO. By modifying HYPO-He\* we also found a linear correlation between HYPO-He\* and %HYPO. We found that RET-He and HYPO-He parameters have a better diagnostic value, compared to CHr and %HYPO parameters, in defining iron deficiency. The presence of an acute inflammation (CRP > 5 mg/L) in patients with chronic kidney disease had no effect on the conducted measurements. We concluded that our studied parameters, irrespective to parameter determination, are useful in assessment erythropoietic activity and helpful in defining anemias.

Key words: Anemia, assessment of erythropoietic activity, erythrocyte and reticulocyte parameters, agreement, diagnostic value.



**SEZNAM KRATIC**

KRATICA	POMEN
ACD	Anemija pri kronični bolezni/vnetju <i>ang. Anemia of chronic disease</i>
CHr	Vsebnost hemoglobina v retikulocitih <i>ang. Reticulocyte hemoglobin content</i>
CIA	Anemija pri zdravljenju s kemoterapijo <i>ang. Chemotherapy induced anemia</i>
CKD	Kronična ledvična bolezen <i>ang. Chronic kidney disease</i>
FSC	Prednje sipanje laserja <i>ang. Forward scatter count</i>
HYPO-He	Delež hipohromnih eritrocitov s hemoglobinom < 17 pg
%HYPO	Delež hipohromnih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina < 280 g/L
IRF	Delež nezrelih retikulocitov <i>ang. Immature reticulocytes fraction</i>
RET-He	Hemoglobin v retikulocitih <i>ang. Reticulocyte hemoglobin equivalent</i>
RET-Y	Parameter prednjega sipanja laserske svetlobe na retikulocitih
SDA	Sideropenična anemija <i>ang. Iron deficiency anemia</i>
SFL	Stransko sipanje fluorescence <i>ang. Side fluorescent light</i>
SSC	Stransko sipanje laserske svetlobe <i>ang. Side scatter count</i>

## 1 UVOD

### 1.1 Definicija anemije in klinična slika

V periferni krvi je življenjska doba eritrocitov od 100 do 120 dni. Dnevno se odstrani in nadomesti 1 % vseh eritrocitov v telesu. Stare eritrocite iz krvi odstranijo makrofagi retikuloendotelijskega sistema vranice, jeter in kostnega mozga. Odstranitev starih eritrocitov sproži pozitivno povratno zanko s signalom za tvorbo novih eritrocitov v kostnem mozgu. Zmanjšana masa eritrocitov v krvi je posledica izgube eritrocitov iz krvnega obtoka in/ali neučinkovite tvorbe novih eritrocitov v kostnem mozgu. Funkcijsko je anemija opredeljena kot stanje, pri katerem je zmanjšana dostava kisika v periferna tkiva zaradi nezadostne mase eritrocitov v krvi (1). V klinični hematologiji opredelimo anemijo kot stanje, kjer je koncentracija hemoglobina pod 140 g/L za moške in pod 120 g/L za ženske ob upoštevanju nespremenjenega volumna krvne plazme. Nespecifični simptomi anemij so bledica kože in sluznic, tahikardija, povečan pulzni tlak, edemi in spremembe na srcu. Specifični simptomi pa so vnetje požiralnika, atrofija želodca, vnetje ustne sluznice, krči v nogah in pojav pagofagije (2, 3, 4).

#### 1.1.1 Pica in pagofagija

Pica je strokovno ime za kompulzivno motnjo prenejanja s snovmi brez hranilne vrednosti. Pagofagija je ena izmed motenj, za katero je značilno prenejanje z ledom, ki olajša vnetje ustne sluznice. Vnetje ustne sluznice je pogosto znak hudega pomanjkanja železa v krvi. Posledica vnetja je spremenjen okus v ustih in ljudje posledično jedo sodo, glino, zobno pasto ter druge ne hranilne snovi. Značilna je tudi želja po hladni hrani npr. sladoledu. Ko so izpraznjene vse zaloge železa in je metabolno delovanje encimov zavrto, se zaradi pomanjkanja železovih ionov kot kofaktorjev encimov pojavijo motnje v delovanju tkiv in spremembe obnašanja (5). Pagofagija ni življenjsko nevarna motnja in se jo zelo enostavno zdravi. Dokazano je, da se prenejanje z ledom preneha po aplikaciji parenteralnih pripravkov železa. Rezultati so vidni po dveh tednih zdravljenja (6).

Poleg pice se ob hudem pomanjkanju železa, pojavi tudi razdražljivost, glavoboli in spremembe na sluznici požiralnika, imenovane Plummer-Vinsonov sindrom.

Tudi v preteklosti so povezovali pomanjkanje železa s koilonihijo, sploščenimi in vdolbenimi nohti v obliki jušne žlice (7).

## 1.2 Vzroki nastanka in razvrstitev anemij

Najpogostejši vzrok nastanka anemije je pomanjkljiva prehrana. Danes je pomanjkanje železa diagnosticirano pri približno dveh milijardah ljudi po vsem svetu (7). Geografsko ločimo dva pomembna načina nastanka anemije. Prvi je značilen za države v razvoju, kjer na pojav anemije vplivajo pomanjkljiva prehrana, okužbe, vnetne bolezni in krvavitve zaradi parazitov. Svetovni zdravstveni problem v državah tretjega sveta predstavlja malarija, katere povzročitelj je *Plasmodium falciparum/vivax*, prenaša pa jo komar mrzličar. Povzroči malarijsko anemijo. Sproščajo se številni citokini, ki povečajo raven hepcidina. Posledica je neučinkovita eritropoeza zaradi preprečene absorpcije železa preko feroportina (8). V razvitih državah je anemija posledica sodobnih trendov prehranjevanja z izločanjem določenih vrst živil, npr. vegetarijanstvo, veganstvo, ter pomanjkljivega vnosa železa ob povečanih potrebah. Druga stanja, kjer se pomanjkanje železa še lahko pojavi, so izguba krvi med in po operativnih posegih, krvne bolezni z neučinkovito eritropoezo in zdravljenje z obsevanjem ali kemoterapijo (9).

Če razvrstimo anemije glede na vzrok nastanka, ločimo anemije zaradi pomanjkljivega nastajanja ali povečanega razpada eritrocitov. Pomanjkljivo nastajanje eritrocitov je lahko posledica napak v sintezi hema, motenega nastajanja DNA, okvar matične celice, infiltracije rakastih celic v kostnem mozgu in kroničnega vnetja. Motnje v sintezi hema povzročajo sideropenično anemijo, sideroblastno anemijo in talasemije. Pri megaloblastni anemiji je moten nastanek DNK, zato se v kostnem mozgu pojavijo značilni megaloblasti. Aplastična anemija je posledica okvare pluripotentne matične celice, zato se v krvi pojavi pancitopenija. Mielofizično anemijo povzroči razrast rakavih celic v kostnem mozgu, moten nastanek eritrocitov pa je značilen tudi pri kroničnem vnetju, ledvični odpovedi in jetrni bolezni.

Anemije zaradi povečanega razpada ali izgube eritrocitov razdelimo na korpuskularne (dedne z izjemo paroksizmalne nočne hemoglobinurije (PNH)), ekstrakorpuskularne (pridobljene) hemolitične anemije in anemijo po akutni krvavitvi (3).

Med korpuskularne uvrščamo dedno sferocitozo in dedno eliptocitozo, ki nastaneta zaradi napake v sintezi eritrocitne membrane, hemoglobinopatije, ki nastanejo zaradi motene sinteze globina, encimopatije, ki nastanejo zaradi pomanjkanja membranskih encimov in PNH, ki nastane zaradi mutacije matične celice ter povzroči povečano občutljivost eritrocitov za delovanje komplementa. Med ekstrakorpuskularne uvrščamo imunske in avtoimunske hemolitične anemije, anemije zaradi mehanskih okvar eritrocitne membrane in anemije drugih vzrokov poškodb eritrocitov (opekline, okužbe, zastrupitve) (3).

### 1.3 Sideropenična anemija

#### 1.3.1 Zgodovinski pregled

Že v antiki so začeli raziskovati pomen železa in njegovo vlogo v človeškem telesu. V času rimskega cesarstva so zdravili simptome anemije s pomočjo parnih kopeli. Bledica, utrujenost in drugi znaki so zaradi železovih soli, ki so bile dodane v kopelih, začasno izginili. Z odkritjem krvnih celic in krvnega obtoka so se začeli razvijati številni načini preiskovanja krvnih sprememb. Najpomembnejše odkritje 18. stoletja je bila uporaba anilinskih barvil za barvanje celic Paula Erlicha. Omogočila so opazovanje morfologije celic v tankem filmu in s tem se je začela doba moderne hematologije. Železo v krvi sta odkrila Lemery in Geoffroy leta 1713 tako, da sta kri zažgala in v pepelu odkrila trdne delce. Pomen anorganskega železa za sintezo hemoglobina so dokazali stoletje kasneje, leta 1874. V 17. stoletju so železo uporabljali za zdravljenje »zelene bolezni« (kloroze), ki jo danes poimenujemo hipohromna anemija, ki lahko nastane zaradi pomanjkanja železa. Klorozo so odkrili pri odraščajočih dekletih, ki so imela motnje menstrualnega cikla ali težave s prebavili. Skozi zgodovino so ugotovili, da ima več različnih bolezni skupen imenovalec, pomanjkanje železa. Tako so nastale prve ideje o sideropenični anemiji (SDA). Po prvi svetovni vojni je zdravnica Helen Mackay s pomočjo raziskav dokazala, da lahko preprečimo sideropenično anemijo pri odraščajočih otrocih. V svojih študijah je ugotovila, da je tveganje za anemijo pri nedojenih otrocih večje kot pri dojenih otrocih. Hkrati je z dodajanjem železa v nadomestke materinega mleka dokazala, da lahko na ta način preprečimo tudi anemijo nedojenih otrok v kasnejšem otroštvu. Danes direktiva Evropske unije o prehrani nedojenih otrok zahteva dodajanje železa in vseh vitaminov v pripravke za prehrano otrok (7, 9).

### 1.3.2 Metabolizem železa

Element železo najdemo v naravi najpogosteje v obliki spojin in je sestavni del zemeljske skorje (10). Ob prisotnosti kisika tvori železove okside z oksidacijskim številom 3+, ki se ne absorbirajo v človeško telo. Nekateri mikroorganizmi, npr. kvasovke, lahko s pomočjo redukcije pridobijo dvovalentno železo iz zraka.

Ljudje vnašamo železo v telo s hrano rastlinskega in živalskega izvora. Železo v dvovalentni obliki vnesemo v telo pretežno z uživanjem rdečega mesa. Absorpcija poteka v duodenumu in zgornjem jejunumu preko dvovalentnega železovega transporterja feroportina v enterocitih (9). Železo se preko mukozne sluznice prenese v kri. Fiziološka pH vrednost sproži oksidacijo  $\text{Fe}^{2+}$  v  $\text{Fe}^{3+}$ , ta pa se preko feroportina ne absorbira v kri. Za absorpcijo je tako nujno potrebna kislota pH vrednost, da prepreči oksidacijo železa, zato želodčna kislina omogoči hitrejšo absorpcijo železa. Posledično se pomanjkanje železa lahko pojavi ob jemanju zaviralcev protonskih črpalk. Drug mehanizem prenosa železa v kri poteka preko hem oksigenaze 1 (HO1). Absorpcija je preko HO1 bolj učinkovita, neodvisna od pH vrednosti, vendar slabše raziskana. V krvi se železo veže na transferin, prenašalni protein, ki železo prenese do kostnega mozga. Tam se porabi za razvoj novih eritrocitov (9).

Zaloge železa so shranjene v tkivnih makrofagih, nekaj se ga shranjuje tudi v hepatocitih. Železo je shranjeno v proteinski kompleks feritina, z oksidacijo pa se pretvori v netopen hemosiderin. Ko je aktivnost eritropoeze povečana, se železo iz makrofagov prenese v kri preko feroportinskih kanalov, ki se nahajajo v membrani makrofagov (11). Pomanjkanje železa v krvi poveča tudi njegovo absorpcijo v tankem črevesu. Presežek železa pa aktivira inhibicijo absorpcije preko hepcidina. Hepcidin je protein, ki se sintetizira v hepatocitih. Sprošča se v obliki prohepcidina, ki se s pomočjo furin konvertaze pretvori v hepcidin. Inhibicija absorpcije železa poteka z vezavo hepcidina na feroportin, kar prepreči eksocitozo železa iz makrofagov v kri in njegovo absorpcijo iz prebavil. Hepcidin s svojo vezavo sproži tudi proteolizo feroportinskih prenašalcev in s tem zmanjša koncentracijo železa v plazmi (9, 12).

### 1.3.3 Pojavnost sideropenične anemije

Sideropenična anemija je najpogostejša mikrocitna anemija. Pojavlja se pri vseh starostih, redkeje pri moških, saj fiziološko izgubijo manj krvi kot ženske. Najpogostejši vzrok sideropenične anemije je krvavitev ob premajhnem nadomeščanju železa.

Krvavitve v majhnem obsegu so vsak mesec prisotne pri ženskah v rodni dobi. V času ene menstrualne krvavitve ženske izgubimo z vsakim mililitrom krvi približno 0,5 mg železa. Med bolj izpostavljenimi za nastanek sideropenične anemije so tudi tisti ljudje, ki imajo kronične vnetne črevesne bolezni, npr. celiakijo, razjedo želodca. Z ustreznim nadomestnim zdravljenjem s pripravki železa lahko anemijo pozdravimo (3, 4).

#### 1.4 Anemije pri kroničnih boleznih/vnetju

Anemija pri kroničnem vnetju (ACD) se pojavi zaradi blokade eksocitoze železa iz zalog makrofagov in proteolize feroportinskih prenašalcev, kar prepreči prenos železa v kri.

Od sideropenične anemije se anemija pri kroničnem vnetju loči po blažjem pomanjkanju železa. Za ACD je značilna visoka koncentracija hepcidina, ki povzroča funkcijsko pomanjkanje železa. Koncentracija feritina je povišana, ker je protein akutne faze vnetja. Funkcijsko pomanjkanje železa nastane zaradi zmanjšane razpoložljivosti železa za tvorbo eritrocitov, kljub normalni ali celo povečani zalogi železa v telesu. V večini primerov se ob zdravljenju in ustreznem nadzoru huda anemija ne pojavi. Absolutno pomanjkanje železa je definirano z zmanjšano koncentracijo železa v plazmi in zmanjšanimi zalogi v makrofagih. Povzroči sideropenično anemijo zaradi neučinkovite eritropoeze. Anemije pri kroničnih vnetjih so pogoste pri rakavih obolenjih. Ločimo dva načina nastanka anemije pri rakavih obolenjih: anemije zaradi kroničnega vnetja ali anemije zaradi uporabe citostatikov in obsevanja (CIA). Pri rakavih obolenjih ACD od absolutnega pomanjkanja železa ločimo na podlagi laboratorijskih meritev hepcidina, feritina, nasičenosti transferina (TSAT%), deleža hipohromnih eritrocitov (%HYPO) in količine hemoglobina v retikulocitih (CHr). Pri ACD dobimo značilno visoke koncentracije hepcidina za razliko od SDA, kjer so te koncentracije nizke. Koncentracija feritina je pri ACD višja od 10 µg/L, medtem ko je pri SDA njegova koncentracija nižja od 10 µg/L (2, 13).

Posebna oblika anemije pri kroničnem vnetju je anemija pri kronični bolezni ledvic (CKD). Bolniki s končno ledvično odpovedjo, ki se zdravijo nadomestno s hemodializo, imajo anemijo zaradi zmanjšane proliferativne funkcije eritroidne prekursorke celice v kostnem mozgu, zmanjšane življenjske dobe eritrocitov in zmanjšane razpoložljivosti železa. Vzrok je neučinkovita sinteza eritropoetina v ledvicah in oslavljen odziv nanj. Za zdravljenje se uporabljajo epoetini in intravenski pripravki železa.

Laboratorijsko spremljanje statusa železa je nujno potrebno, da ne pride do preobremenitve z železom ali do pomanjkanja le-tega. Ločevanje SDA in ACD pri kronični ledvični bolezni poteka s pomočjo določanja koncentracije feritina in C-reaktivnega proteina (CRP) (13, 14). Za SDA so značilne nizke koncentracije železa, zelo nizek povprečni volumen eritrocitov (PVE) in nizke koncentracije feritina. Pri ACD so značilne nizke vrednosti PVE, koncentracija železa je lahko normalna ali celo zvečana, močno povišani pa sta koncentracija feritina in koncentracija CRP. Anemijo pri kronični ledvični bolezni zdravimo z zdravljenjem osnovne bolezni, redko se pojavi sideropenična anemija (15).

### **1.5 Laboratorijska diagnostika sideropenične anemije in anemije pri kroničnih boleznih**

Leta 2004 so v evropskih smernicah predlagali uvedbo mejne koncentracije hemoglobina 110 g/L kot indikator anemije pri kroničnih boleznih/vnetjih ob določitvi naslednjih označevalcev na sodobnih hematoloških analizatorjih: koncentracija hemoglobina za oceno stopnje anemije, povprečni volumen eritrocitov in povprečno količino hemoglobina v eritrocitih za določitev vrste anemije, številčne koncentracije retikulocitov za oceno aktivnosti eritropoeze in serumsko koncentracijo feritina za določitev zaloga železa. Funkcijsko razpoložljivo železo za eritropoezo določimo s pomočjo: deleža hipohromnih eritrocitov, nasičenosti transferina in vsebnosti hemoglobina v retikulocitih. C-reaktivni protein uporabimo za določitev prisotnosti/odsotnosti vnetja (13).

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je opredelila anemijo, kot stanje s koncentracijo hemoglobina  $< 120$  g/L pri ne nosečih ženskah in  $130$  g/L pri moških. Pri odkrivanju sideropenične anemije predlaga meritve različnih parametrov, saj opredelitev diagnoze ni mogoča z meritvijo enega samega. Mejne vrednosti parametrov za potrditev SDA so: zmanjšana koncentracija hemoglobina,  $CRP < 5$  mg/L, serumski feritin  $< 30$   $\mu$ g/L in nasičenost transferina  $< 20$  %.

Za diferencialno diagnostiko sideropenične anemije in anemije pri kronični bolezni/vnetju služi mejna vrednost CRP ( $5$  mg/L), nasičenost transferina, koncentracija topnega transferinskega receptorja, feritinski indeks ( $sTfr/\log(\text{feritin})$ ) in koncentracija serumskega feritina. Vrednosti topnega transferinskega receptorja narastejo ob povečani aktivnosti eritropoeze, prisotnost vnetja pa ne vpliva na njegovo koncentracijo.

Ob prisotnosti vnetja se koncentracija feritina poveča, neodvisno od trenutnih zalog železa, in znižuje vrednosti feritinskega indeksa. Ločevanje SDA in ACD na podlagi feritinskega indeksa v primerjavi s količino hemoglobina v retikulocitih (CHr, RET-He), lahko prikažemo z izrisom grafa s štirimi kvadranti, kjer ločujemo kvadrante glede na zaloge železa za učinkovito eritropoezo in glede na prisotnost/odsotnost vnetja. Na tak način lahko ločimo funkcijsko pomanjkanje železa med ACD in SDA. Pri nekaterih bolnikih se pojavi tudi kombinacija obeh anemij, kjer dobimo pri SDA enake vrednosti kot pri ACD z razliko, da je koncentracija serumskega feritina lahko v referenčnem intervalu 15-200 ng/mL za moške in 15-150 ng/mL za ženske (16, 17, 18).

### **1.5.1 Laboratorijska diagnostika pomanjkanja železa v telesu**

Pri ugotavljanju pomanjkanja železa naredimo biokemijsko in hematološko analizo krvi. Krvna slika pokaže normalno številčno koncentracijo levkocitov, normalno ali rahlo povečano številčno koncentracijo trombocitov, zmanjšano koncentracijo hemoglobina in prisotnost hipohromnih mikrocitov. Ti eritrociti imajo krajšo življenjsko dobo. Posledično nezreli retikulociti vstopijo v krvni obtok in poveča se število hipohromnih celic. Poleg hematoloških preiskav sta glavni določitvi pri ugotavljanju pomanjkanja železa koncentracija feritina v serumu in nasičenost transferina (TSAT%). Zaloge železa ocenimo s koncentracijo feritina, ki je protein akutne faze vnetja. Njegova koncentracija kljub zmanjšani koncentraciji železa in transferina v serumu naraste ob rakavih obolenjih, vnetjih. Če je njegova koncentracija pod 10 µg/L, v telesu praktično ni več zalog železa. Zlati standard ugotavljanja zalog železa predstavlja barvanje kostnega mozga na prisotnost železa s kalijevim ferocianidom, kjer ne najdemo zrnč hemosiderina v primeru absolutnega pomanjkanja železa. Biopsija kostnega mozga ima zaradi invazivnosti postopka vprašljivo diagnostično vrednost (3, 4).

Biorazpoložljivost železa za eritropoezo ocenimo s pomočjo TSAT%. Razpoložljivost železa je zmanjšana, ko je TSAT < 15 %. Meritve koncentracije feritina in nasičenosti transferina ob sočasni meritvi CRP in aktivnosti ALT se redko uporabljajo pri vnetnih boleznih in jetrnih obolenjih. Takrat razpoložljivost železa za eritropoezo lažje in bolj natančno določimo s hematološkimi parametri, deležem hipohromnih eritrocitov (%HYPO, HYPO-He) in količino hemoglobina v retikulocitih (CHr, RET-He).



Hematološki parametri so koristni za postavitev diagnoze sideropenične anemije ter pri spremljanju zdravljenja z epoetini in intravenskimi pripravki železa. Pri diagnostiki talasemij in rakavih obolenj je njihova uporabnost vprašljiva (2, 4, 19).

## **1.6 Vloga hemoglobina v retikulocitih ter deleža hipohromnih eritrocitov pri opredelitvi anemije**

Meritev količine hemoglobina v retikulocitih (CHr, RET-He) omogoča direktno oceno vgradnje železa v hemoglobin retikulocitov. Kratka življenjska doba retikulocitov vpliva na dobro občutljivost CHr oziroma RET-He, za oceno trenutne razpoložljivosti železa v kostnem mozgu za eritropoezo. Parameter CHr je dovolj občutljiv, da zgodaj pokaže porušeno ravnovesje med razpoložljivostjo železa in eritropoezo, še pred padcem koncentracije hemoglobina. Leta 1997 je bil vpeljan v Evropske smernice za spremljanje anemije pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo kot boljši napovedni dejavnik za pomanjkanje železa, v primerjavi s povprečnim volumnom eritrocitov, koncentracijo serumskega feritina in nasičenostjo transferina. Spodnja referenčna meja CHr je 28-29 pg (13, 19).

Delež hipohromnih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina  $< 280$  g/L (%HYPO) in delež hipohromnih eritrocitov s PHE  $< 17$  pg (HYPO-He) sta parametra, ki določata pomanjkanje železa v 120 dnevnom obdobju. Korelacija med deležem hipohromnih eritrocitov in pomanjkanjem železa je odvisna od življenjske dobe eritrocitov. Vrednost %HYPO  $< 5$  % nakazuje na dobro aktivnost eritropoeze ter zadostno razpoložljivost železa za vgradnjo v hemoglobin. V diagnostiki se uporabljata dve mejni vrednosti; %HYPO  $> 5$  % za funkcijsko pomanjkanje železa in %HYPO  $> 10$  % za absolutno pomanjkanje železa. Normalna koncentracija hemoglobina ne izključuje pomanjkanja železa v telesu. Zdrave osebe morajo izgubiti velik del zalog železa preden koncentracija hemoglobina pade pod spodnjo referenčno vrednost. V primeru latentnega pomanjkanja železa se raje poslužujemo uporabe eritrocitnih in retikulocitnih parametrov, ki odražajo kvaliteto eritropoeze v preteklih dveh dneh (13, 19).

### **1.6.1 Vpeljava merjenja količine hemoglobina v retikulocitih v diagnostiko anemij**

RET-He je nadomestil predhodni parameter RET-Y, ki je rezultat prednjega sipanja laserja v odvisnosti od velikosti celice in vsebnosti hemoglobina.

RET-He je računaska pretvorba povprečne vsebnosti hemoglobina v retikulocitih. Raziskava je pokazala zelo dobro korelacijo med CHr in RET-Y ( $r^2 = 0,94$ ) (20). ROC analiza je pokazala visoko diagnostično uporabnost parametra RET-Y pri zmerni ali hudi anemiji. Dokazali so, da RET-Y daje enake rezultate kot CHr pri bolnikih, ki prejemajo terapijo železa i.v., in pri odkrivanju novih primerov SDA (20). Za oceno, katere lastnosti celic najbolj vplivajo na vrednost RET-Y, so primerjali ta parameter s PVE in PHE. Korelacija je bila boljša pri PHE  $r^2 = 0,97$  kot pri PVE  $r^2 = 0,85$ . Zaključili so, da sipanje prednjega laserja pove veliko več o vsebnosti hemoglobina v celici kot o njenem volumnu (21).

Prednost RET-He v primerjavi s klasičnimi biokemičnimi parametri, je krajši časovni zamik do zaznavanja pomanjkanja železa. Meritev vsebnosti hemoglobina v retikulocitih omogoča spremljanje funkcijskega pomanjkanja železa pri bolnikih, ki prejemajo eritropoetin in opredelitev pomanjkanja železa pri otrocih. Edino omejitev predstavlja infrastruktura, saj sta parametra CHr in RET-He odvisna od nakupa opreme (22).

### **1.6.2 Primerjava parametrov za oceno količine hemoglobina v retikulocitih**

Dokazali so dobro korelacijo med parametroma CHr in RET-He ( $r^2 = 0,92$ ) (21). Ugotovili so, da sta parametra povsem zamenljiva brez izgube občutljivosti ali specifičnosti (21). Referenčni intervali, ki so jih postavili, so za RET-He 28,2 – 35,7 pg (21) oziroma 24,1 – 38,8 pg (22) oziroma 29,8 – 37,7 pg (23), za CHr pa 23,3 – 34,1 pg (22).

## **1.7 Ugotavljanje funkcijskega pomanjkanja železa pri sideropenični anemiji**

S pomočjo ROC analize so določili mejno vrednost RET-He za ugotavljanje sideropenične anemije pri hemodializnih bolnikih. Ta je 27,2 pg, pri čemer so dokazali, da se sideropenična anemija pri tej mejni vrednosti lahko opredeli s 93,3 % občutljivostjo in s 83,2 % specifičnostjo. Površina pod krivuljo (AUC) je bila 0,913 ( $P < 0,0001$ ).

ROC krivulje RET-He pri ugotavljanju funkcijskega pomanjkanja železa pri hemodializnih bolnikih so pokazale slabšo diagnostično uporabnost z AUC 0,657 ( $P < 0,0001$ ) in mejno vrednostjo RET-He 27,9 pg. Občutljivost je bila 40,2 % in specifičnost 80,3 % (22). V drugi študiji (23) so uporabo RET-He pri ugotavljanju SDA postavili pri 25 pg s 76 % občutljivostjo in s 81 % specifičnostjo. Površina pod krivuljo je bila 0,9.

Pri populaciji ljudi z različnimi anemijami so dokazali, da zmanjšane vrednosti RET-He v 32 % najdemo pri sideropenični anemiji. Povprečje meritev RET-He je bilo najnižje pri bolnikih s SDA. Na podlagi znatno nižjih vrednosti RET-He pri SDA so dokazali, da mejna vrednost 25 pg omogoča diferencialno diagnostiko SDA in ACD. S tem so potrdili enako uporabnost RET-He in CHr za diferencialno diagnostiko anemij (23).

Parameter CHr je bil v študijah ovrednoten tudi kot napovedni dejavnik sideropenične anemije. Mejno vrednost 29 pg so določili kot dejavnik tveganja za razvoj SDA z 90,6 % občutljivostjo in 66,7 % specifičnostjo (24).

Določili so mejno vrednost CHr  $< 32,4$  pg s 96 % občutljivostjo in 84 % specifičnostjo, za odkrivanje pomanjkanja železa pri hemodializnih bolnikih. Meritev CHr je imela dobro ponovljivost s koeficientom variacije 1,6 % pri 25,4 pg in 2,2 % pri 34,5 pg. Delež retikulocitov ni pokazal značilnih razlik med skupinama, medtem ko so se vrednosti CHr značilno razlikovale. Pri skupini s pomanjkanjem železa je bilo povprečje CHr  $29,9 \pm 1,9$  pg, pri skupini brez pomanjkanja železa pa  $33,7 \pm 1,4$  pg (25). V primerjalni študiji pri bolnikih z različnimi anemijami so določili referenčni interval za parameter HYPO-He upoštevaje 95. percentil 124-ih vrednosti zdravih oseb in določili referenčni interval 0,0 – 0,6 % (26). Rezultati, ki so jih dobili, so podobni tistim v drugih študijah (23), in kažejo največjo razliko v povprečni vrednosti RET-He med zdravimi osebami in bolniki s SDA (27).

### **1.7.1 Funkcijsko pomanjkanja železa pri kronični ledvični bolezni**

Tudi povprečne vrednosti HYPO-He pri različnih skupinah bolnikov z anemijo se razlikujejo (zdravi  $0,3 \pm 0,16$  %, SDA  $16,2 \pm 15,8$  %, CKD  $1,7 \pm 1,8$  %).

Z ROC analizo so določili mejni vrednosti za pomanjkanje železa za RET-He  $< 29$  pg in za HYPO-He  $> 1,8$  %. Analiza je pokazala dobro diagnostično uporabnost obeh mejnih vrednosti z AUC = 0,963 pri 98,3 % občutljivosti in 91,1 % specifičnosti (27).

Uporabno vrednost parametra RET-He pri hemodializnih bolnikih pri spremljanju učinkov parenteralnega zdravljenja z železom so dokazali v študiji, v katero je bilo vključenih 217 bolnikov (28). Korelacija med RET-He in CHr je bila dobra,  $r^2 = 0,858$ . Določili so mejno vrednost RET-He = 33 pg s 74,3 % občutljivostjo in 64,9 % specifičnostjo. Diagnostična učinkovitost pri tej mejni vrednosti je zadovoljiva (AUC = 0,776).

Nad to vrednostjo je odgovor na zdravljenje z železom dober, saj je na voljo zadostna količina železa za eritropoezo. Zaključili so, da je zaradi hitrejšega porasta parametra ob učinkovitem zdravljenju določitev RET-He za spremljanje učinkov zdravljenja bolj uporabna od koncentracije hemoglobina (28).

Uporabo parametra RET-He so raziskovali tudi pri starejših bolnikih. Mejno vrednost RET-He za ugotavljanje SDA so postavili pri 27,2 pg s 93,3 % občutljivostjo in 83,2 % specifičnostjo, kar je primerljivo z drugimi avtorji (22). Površina pod krivuljo je bila 0,82 s 95 % intervalom zaupanja. Zaključili so, da parameter RET-He v primerjavi s PVE, PHE in PKHE ne izboljša diferencialne diagnostike med SDA in ACD pri tej populaciji (29).

### **1.8 Uporabnost določanja deleža hipohromnih eritrocitov za oceno aktivnosti eritropoeze**

Uporabnost kombinacije parametrov RET-He in HYPO-He za oceno aktivnosti eritropoeze in razpoložljivosti železa so ugotavljali pri bolnikih s CKD in SDA. Z uporabo neodvisnega t-testa so ugotovili značilno razliko med skupinama (30). Rezultati so pokazali nizko razpoložljivost železa za eritropoezo pri bolnikih s SDA, ki imajo znižan PHE in zvišan HYPO-He. Nižje so tudi vrednosti RET-He, zato lahko sklepamo na slabo razpoložljivost železa v kostnem mozgu. Pri bolnikih s CKD so bile povišane povprečne vrednosti deleža retikulocitov, RET-He in znižane povprečne vrednosti HYPO-He. Rezultat dokazuje pospešeno eritropoezo in zadostno razpoložljivost železa pri teh bolnikih.

Mejne vrednosti za določitev pomanjkanja železa so postavili za RET-He 29,8 pg z 90,7 % občutljivostjo in 83,1 % specifičnostjo in za HYPO-He 5,8 % s 86,1 % občutljivostjo in 88 % specifičnostjo. Površina pod krivuljo je bila za RET-He 0,935 ter za HYPO-He 0,916. Podobnost AUC pri obeh parametrih nakazuje na njuno dobro korelacijo (30).

Za opredelitev tistih bolnikov, ki potrebujejo nadomeščanje železa, evropske smernice navajajo mejno vrednost za  $CHr < 29$  pg in/ali  $\%HYPO > 10$  % (13).

Prve raziskave o korelaciji med  $\%HYPO$  in primerljivim parametrom so bile narejene, ko parametra  $HYPO-He$  še ni bilo.  $DF\ HYPO\ XE$  je bil raziskovalni parameter, ki so ga izračunali s pomočjo meritev  $Ht$ ,  $Hb$  in  $RET-He$ . Dobili so dobro korelacijo med parametroma ( $r = 0,89$ ) (31).

Številaska razlika med vrednostmi  $\%HYPO$  in  $HYPO-He$  je posledica načina izračuna teh parametrov. Vsi eritrociti s  $PKHE < 280$  g/L so razvrščeni v  $\%HYPO$ .  $HYPO-He$  pa izraža vsebnost  $Hb$  v vsaki posamezni celici, ne njegove koncentracije, zato so referenčne vrednosti med parametroma različne. V Evropskih smernicah za spremljanje in zdravljenje kroničnih hemodializnih bolnikov noben od parametrov ni namenjen oceni aktivnosti eritropoeze. Primerjava parametrov  $\%HYPO$  in  $HYPO-He$  pokaže znatno razliko med parametroma na račun višjih vrednosti  $\%HYPO$ . Z naraščajočo vrednostjo  $\%HYPO$  se razlika med parametroma povečuje.

Na podlagi tega so predlagali ne-linearno povezavo med parametroma, ki jo opisuje polinomska enačba drugega reda, s katero se lahko preračuna mejne vrednosti  $HYPO-He$  na podlagi mednarodno določenih referenčnih vrednosti za  $\%HYPO$ . Prva mejna vrednost  $\%HYPO$  je 6 % za zaznavanje funkcijskega pomanjkanja železa in ustreza 2,7 %  $HYPO-He$ . Druga mejna vrednost je 10 % za detekcijo absolutnega pomanjkanja železa, kar ustreza 4,5 %  $HYPO-He$  (32).

Druge študije so dokazale mejno vrednost pomanjkanja železa 3,7 % za  $\%HYPO$  (33). Pokazali so še, da vrednosti pod 3,7 % ob rezistenci na epoetin, ne ustrezajo pomanjkanju železa v telesu, nad 3,7 % pa je pomanjkanje železa lahko funkcijsko ali absolutno. Bistven rezultat je tudi eksperimentalno določena mejna vrednost  $HYPO-He$ . Enak rezultat te vrednosti dobimo tudi po računski pretvorbi 6 % vrednosti parametra  $\%HYPO$ .

Najboljša napovedna dejavnika odziva na terapijo predstavljata  $RET-He$  ali  $CHr$ , ki lahko v kombinaciji s  $\%HYPO$  pri  $< 5,8$  % uspešno pripomoreta k spremljanju zdravljenja. Parameter  $HYPO-He$  je alternativna možnost v določenih kliničnih primerih (32).

Smiselnost uporabe HYPO-He pri diagnostiki SDA in njenem razlikovanju od ACD so potrdili v študiji, ki je pokazala, da je parameter HYPO-He zanesljiv tudi pri oceni pomanjkanja železa ob prisotnosti vnetja. Njegove povprečne vrednosti pri zdravih osebah so  $0,3 \pm 0,16$  % pri moških in  $0,3 \pm 0,18$  % pri ženskah. Najvišje povprečne vrednosti so znova značilne za bolnike s SDA (34).

Za oceno pomanjkanja železa je ROC analiza pokazala 91,5 % občutljivost in 80,9 % specifičnost pri mejni vrednosti HYPO-He 3,6 % (34). Meritve %HYPO dobro korelirajo z nizkimi vrednostmi parametra CHr (35).

### **1.9 Vplivi bioloških in analitskih dejavnikov na količino hemoglobina v retikulocitih in delež hipohromnih eritrocitov**

Na podlagi določanj ob različnih časovnih zamikih od odvzema (6, 12, 24 in 48 ur) so ugotovili dobro stabilnost parametra RET-He. Razlika manjša od 1 SD je bila izmerjena po 48-ih urah od odvzema krvi z EDTA, na sobni temperaturi in v hladilniku (22). Stabilnost HYPO-He in %HYPO je slabša zaradi nabrekanja eritrocitov na sobni temperaturi. Posledica je znižanje PKHE in povišanje %HYPO (36). V preteklosti so zato mejno vrednost %HYPO postavili previsoko (10 %). Na podlagi ugotovitev številnih študij se je kasneje meja pomaknila na 3,7 % (33).

Biološki dejavniki, ki vplivajo na rezultate so preiskovančev spol, starost, rasa, telesna aktivnost, prehranske navade, telesna teža in cirkadiani ritem. Vsi ti dejavniki vplivajo na meritve *in-vivo* in jih z dobro laboratorijsko prakso ne moremo preprečiti. Medtem ko je analitična variacija podobna pri vseh parametrih ( $< 3$  %) z izjemo feritina (6,9 %), pa imajo biološki dejavniki največji vpliv na TSAT (38,2 %) in koncentracijo feritina (15,1 %). Biološka variacija hematoloških parametrov je  $< 5$  % (37).

### **1.10 Določanje deleža nezrelih retikulocitov**

Delež nezrelih retikulocitov (IRF) je zgodnji označevalec povečane aktivnosti eritropoeze. Je vsota dveh podskupin retikulocitov, in sicer srednje-zrelih retikulocitov s srednje visoko fluorescenco in nezrelih retikulocitov z visoko fluorescenco (**Slika 1**).

Vrednosti IRF se povečajo v nekaj urah po pospešeni eritropoezi, ki jo stimuliramo z epoetinom, medtem ko se številčna koncentracija retikulocitov poveča šele v 72-ih urah. Pri stimulaciji eritropoeze brez povečanih vrednosti IRF lahko sklepamo, da bolnik ni odziven na zdravljenje z epoetinom. Referenčne vrednosti IRF pri ženskah so 1,1 – 15,9 % in pri moških 1,5 – 13,7 % (38). Visoke vrednosti parametra IRF so značilne za hemolitične anemije in akutno levkemijo, medtem ko najdemo nizke vrednosti pri aplaziji kostnega mozga. Pri diagnostiki anemij je uporaba parametra IRF smiselna za oceno aktivnosti eritropoeze. Druga možna uporaba pa je spremljanje zdravljenja kroničnih hemodializnih bolnikov in njihovega odziva na zdravljenje z epoetini.

## 2 NAMEN DELA

V raziskovalnem delu želimo ugotoviti uporabnost eritrocitnih in retikulocitnih parametrov pri oceni eritropoeze. Naša raziskava se bo osredotočala na parametre kot so: količina hemoglobina v retikulocitih (RET-He), delež nezrelih retikulocitov (IRF) in delež hipohromnih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina  $< 17$  pg (HYPO-He). Ugotoviti želimo, kakšna je povezava med parametroma RET-He in HYPO-He ter med parametroma CHr in %HYPO, ki sta široko uporabljana pri obravnavi hemodializnih bolnikov. Navedene parametre bomo določili skupaj s celotno krvno sliko pri zdravih osebah, bolnikih s sideropenično anemijo in bolnikih s kronično ledvično boleznijo. Naš vzorec bo polna kri, odvzeta z antikoagulantom  $K_3$ -EDTA. Analizirali jo bomo najkasneje v štirih urah po odvzemu. Rezultate bomo statistično obdelali s programi Excel, SPSS in MedCalc, da bi ocenili korelacijo med parametri RET-He in CHr ter HYPO-He in %HYPO. Pričakujemo, da bodo vrednosti RET-He dobro korelirale z vrednostmi CHr, medtem ko naj bi korelacija med HYPO-He in %HYPO sledila krivulji, ki opisuje enačbo drugega reda.

V raziskavo bomo vključili tri različne skupine preiskovancev. Prvo skupino bomo oblikovali iz vzorcev zdravih oseb, pri katerih bodo vrednosti krvne slike znotraj določenih referenčnih intervalov za zdrave osebe Specializiranega hematološkega laboratorija.

Druga skupina bodo vzorci bolnikov s sideropenično anemijo. Vzorce bomo zbirali na podlagi predhodno potrjene sideropenične anemije ob izključenem vnetju (koncentracija hemoglobina  $< 120$  g/L in CRP  $< 5$  mg/L).

Tretja skupina bodo vzorci hemodializnih bolnikov s kronično ledvično odpovedjo. Znotraj skupine bomo oblikovali tri podskupine bolnikov z anemijo (hemoglobin  $< 120$  g/L). V prvo podskupino bomo vključili vzorce bolnikov brez vnetja in brez pomanjkanja železa (CRP  $\leq 5$  mg/L), v drugi podskupini bodo vzorci bolnikov brez vnetja in z znaki pomanjkanja železa (CRP  $\leq 5$  mg/L, koncentracija feritina  $< 200$   $\mu$ g/L in nasičenostjo transferina  $< 20$  %). V tretji podskupini bodo vzorci bolnikov z znaki vnetja in brez pomanjkanja železa (CRP  $> 5$  mg/L).



Na podlagi rezultatov posameznih podskupin, bomo postavili mejne vrednosti RET-He in HYPO-He za oceno učinkovitosti zdravljenja z nadomestki železa ter mejne vrednosti za identifikacijo anemije pri kroničnem vnetju in sideropenične anemije pri bolnikih na hemodializi. Pričakujemo, da bodo vrednosti RET-He značilno nižje in HYPO-He ter IRF značilno višje pri skupini s pomanjkanjem železa glede na ostali skupini.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Zbiranje vzorcev

Zbirali smo vzorce polne krvi, odvzete v 3 mL epruvete z 1,8 mg napršenega K<sub>3</sub>EDTA. Vzorce zdravih oseb in bolnikov s sideropenično anemijo smo dobili v Hematološki ambulanti, ki deluje v okviru Interne klinike – Kliničnega Oddelka za hematologijo v UKC Ljubljana. Vzorce smo analizirali v roku petnajstih minut od časa odvzema. Pred vstavitvijo v hematološki analizator Sysmex XN-1000 smo vzorce ročno premešali 8 – 10 krat. Po analizi smo vzorce odnesli v Urgentni laboratorij Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo UKC LJ, kjer smo ponovno naredili krvno sliko z retikulociti na analizatorju Advia 120. Zdrave osebe smo izbrali na podlagi krvne slike, v kateri so bile vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti Specializiranega hematološkega laboratorija. Referenčne vrednosti so v Prilogi I (**Preglednica IX**). Zbirali smo vzorce bolnikov s predhodno potrjeno sideropenično anemijo z izključenim vnetjem (CRP ≤ 5 mg/L). Dodatno smo izločili bolnike, ki so imeli poleg SDA še druge hematološke bolezni. Vzorce bolnikov s kronično ledvično odpovedjo na hemodializi smo zbirali v dnevnem dializnem centru UKC LJ.

#### 3.2 Določanje eritrocitnih in retikulocitnih parametrov

##### 3.2.1 Hematološki analizator Sysmex-XN 1000

Hematološki analizator XN-1000 je najmanjši v seriji XN aparatov Sysmex. Glede na vzorec nudi dve vrsti analiz, in sicer krvne preiskave ter preiskave telesnih tekočin. Deluje s pomočjo sedmih analiznih kanalov: WNR, WDF, WPC, RET, PLT-F, RBC/PLT in HGB. Tehnika meritve, ki jo aparat uporablja, je pretočna citometrija s polprevodnim laserjem. Valovna dolžina laserske svetlobe je 633 nm in omogoča analizo na treh nivojih: prednje sipanje laserja (FSC), stransko sipanje laserja (SSC) ter stransko sipanje fluorescenčne svetlobe (SFL). Intenziteta FCS in SSC, ki jo zaznajo fotodiode, odraža površinsko strukturo celic, notranjo strukturo celic, obliko celičnega jedra in odbojnost celic. Na splošno je signal FCS višji pri večjih celicah, signal SSC pa je višji pri bolj granuliranih celicah.

Intenziteta SFL je odvisna od vrste in količine aminokislin v celici in celičnih organelov. Meritve retikulocitov in njihovih parametrov potekajo v kanalu RET (39, 40, 41).

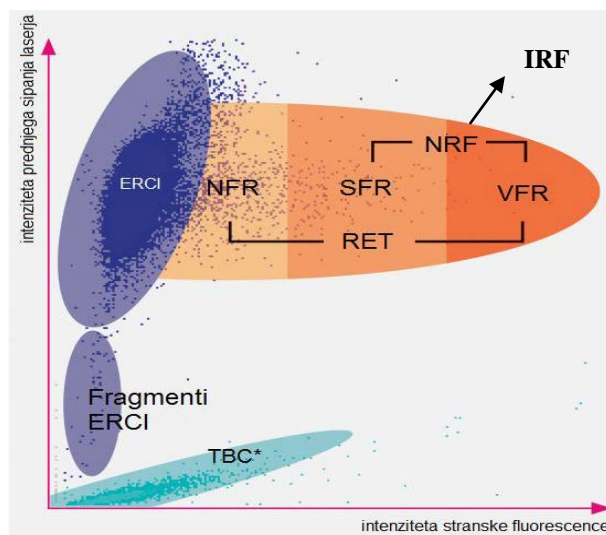
V korporaciji Sysmex so na podlagi rezultatov 176 zdravih žensk in 133 zdravih moških med 16 – 63 letom starosti postavili referenčne intervale za eritrocitne in retikulocitne parametre. Referenčni interval za RET-He je 32,1 – 38,8 pg za oba spola, za HYPO-He pa 0,1 – 0,5 % za moške in 0,1 – 1,1 % za ženske (42).

### 3.2.2 Način določanja parametrov

Parametre RET-He, IRF in HYPO-He analizator določa v retikulocitnem kanalu. Fluorocell RET je fluorescenčno barvilo, ki obarva ribonukleinske kisline v retikulocitih. Na podlagi različne intenzitete fluorescence analizator ločuje različne zrelostne stopnje retikulocitov.

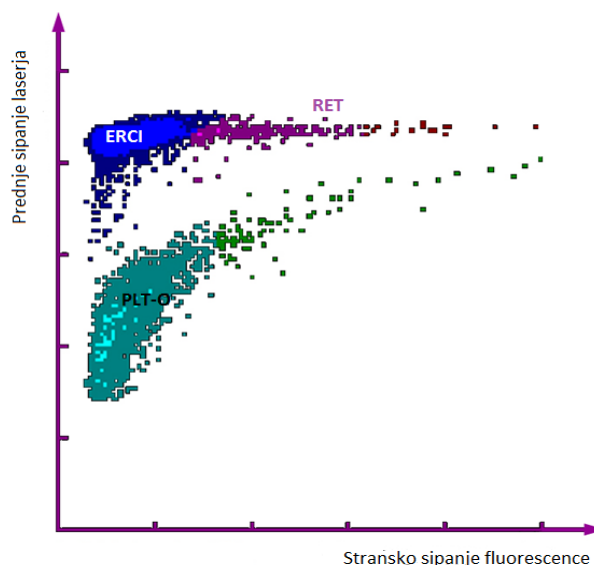
Diagram odvisnosti intenzitete prednjega sipanja laserja od stranske fluorescence, prikazuje razlike v intenziteti fluorescence glede na razvojne faze retikulocitov (**Slika 1**). Vsebnost nukleinskih kislin v retikulocitih se manjša z dozorevanjem celic, zato je fluorescenca nižja pri zrelih retikulocitih, ki se izplavljajo v krvni obtok.

Parameter RET-He analizator izračuna na podlagi enačbe, ki je poslovna skrivnost Sysmexa (43). Parameter HYPO-He analizator določi s pomočjo RET diagrama na podlagi razmerja med številom signalov nizke intenzitete prednjega sipanja laserja in številom zrelih eritrocitov. Parameter IRF je indeks zrelosti retikulocitov. Je vsota retikulocitov s srednje visoko ter visoko fluorescenco in predstavlja seštevke nezrelih retikulocitov (39).



**Slika 1: Značilni razsevni diagram eritrocitnega kanala**

ERCI-eritrociti, NRF-nizka fluorescenca retikulocitov, SFR-srednja fluorescenca retikulocitov, VFR-visoka fluorescenca retikulocitov, NRF-nezrela frakcija retikulocitov, RET-retikulociti, TBC\*-trombociti merjeni v retikulocitnem kanalu. Povzeto po (43).



**Slika 2: Značilen razsevni diagram retikulocitnega kanala**

ERCI-eritrociti, RET-retikulociti, PLT-O-trombociti. Povzeto po (44).

### 3.2.3 Hematološki analizator Advia 120

Parametra CHR in %HYPO smo določili na analizatorju Advia 120 proizvajalca Siemens Bayer Diagnostics. Analizator določa parametra s citokemično metodo. Analiza poteka v dveh korakih. V prvem koraku retikulociti spremenijo svojo obliko zaradi dodajanja površinsko aktivnih snovi, vendar ne pride do spremembe volumna celice.

V drugem koraku se v celicah obarvajo nukleinske kisline z Oksazinom 750. Analizator meri tudi absorbanco laserske svetlobe na podlagi katere razdeli retikulocite v tri zrelostne stopnje. Delež hipohromnih eritrocitov določi s hkratnim merjenjem intenzivnosti laserja pod nizkim kotom, ki poda informacijo o volumnu eritrocita in intenzivnosti laserja pod visokim kotom, s katero preko refrakcijskega indeksa določi koncentracijo hemoglobina v eritrocitih (45, 46).

### **3.3 Reagenti in kontrole**

Aparat XN-1000 uporablja reagente družbe Sysmex corporation, katere priklopljamo na sistem s pomočjo optičnega čitalnika EAN kod, ki so označene na reagentih. Na ta način je zagotovljena sledljivost porabe reagentov in sledljivost rokov uporabe. Vsi reagenti morajo biti zaščiteni pred neposredno sončno svetlobo (39, 43). Dnevno smo izvajali analize treh kontrolnih vzorcev na treh različnih koncentracijskih nivojih. Kontrole smo izvedli po vsaki seriji 50-ih vzorcev. Kontrole so bile znotraj dovoljenih odstopanj pred začetkom meritev in po vsaki seriji petdesetih opravljenih analiz. Hranjene so bili v hladilniku med 2 in 8°C. Pred analizo smo kontrole ogreli na sobno temperaturo, ki je bila v povprečju 26,5°C in jih 8-10 krat ročno premešali. Po navodilih proizvajalca se morajo kontrolni vzorci segreti na 15-30°C pred samo analizo. Rok uporabe posameznega kompleta kontrol je 2 meseca, epruvete iz posameznega kompleta je potrebno menjavati tedensko.

**Preglednica I: Reagenti za analizator Sysmex XN-1000 (42).**

Reagent	Uporaba	Kanal	Sestava
CELLPACK DSL	Nosilna tekočina, redčenje vzorca, merjenje Hb	ERCI-TBC	0,7 % NaCl 0,2 % Tris pufer 0,02 % K <sub>2</sub> EDTA
CELLPACK DST	Nosilna tekočina, redčenje vzorca	ERCI-TBC	15,7 % NaCl 4,3 % Tris pufer 0,4 % K <sub>2</sub> -EDTA
CELLPACK DFL	Analiza retikulocitov, trombocitov	RET	0,17 % triclin pufer
SULFOLYSER	Merjenje koncentracije Hb	HGB	1,8 g/L natrijev lauril sulfat
LYSERCELL WNR	Bela krvna slika (brez bazofilcev), analiza bazofilcev, NRBC	WNR	0,2 % organska kvartarna amonijeva sol, 0,1 % neionski surfaktant
LYSERCELL WDF	Analiza nevtrofilcev, limfocitov, monocitov, eozinofilcev	WDF	0,07 % organska kvartarna amonijeva sol, 0,17 % neionski surfaktant
LYSERCELL WPC	Reagent za lizo, analiza patološko spremenjenih in nezrelih celic	WPC	0,03 % anionski surfaktant, 0,12 % neionski surfaktant
FLUOROCELL WNR	Fluorescenčni reagent za LKC in ERCI	WNR	0,005 % poli-metinsko barvilo, 99,9 % etilenglikol
FLUOROCELL WDF	Fluorescenčni reagent za diferenciacijo LKC	WDF	0,002 % poli-metinsko barvilo, 3 % metanol, 96,9 % etilenglikol

Reagent	Uporaba	Kanal	Sestava
FLUORCELL RET	Fluorescenčni reagent za RET, TBC*	RET	0,03 % poli-metinsko barvilo, 7,9 % metanol, 92 % etilenglikol
FLUROCELL PLT	Fluorescenčni reagent za TBC	PLT-O	0,003 % oksazinsko barvilo, 99,9 % etilenglikol
FLUROCELL WPC	Fluorescenčni reagent za atipične in nezrele LKC	WPC	0,004 % poli-metinsko barvilo, 15,1 % etanol, 84,8 % etilenglikol
CELLCLEAN AUTO	Čistilni reagent	Vsi kanali	Na-hipoklorit s 5 % klorom

### 3.4 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo zbrali v preglednice v programu Excel (2007). Razdelili smo jih na skupine zdravih in bolnih oseb. Bolnike smo nato dodatno razvrstili glede na diagnozo: bolniki s sideropenično anemijo in bolniki z anemijo pri kronični ledvični bolezni. Bolnike s CKD pa smo nato razdelili še na tri podskupine. Podatke smo obdelali v programu SPSS. Naredili smo opisno statistiko za parametre količine hemoglobina v retikulocitih (RET-He, CHr), delež nezrelih retikulocitov (IRF) in delež hipohromnih eritrocitov (HYPO-He, %HYPO). Porazdelitev podatkov znotraj skupin smo preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov, ki pokaže če je porazdelitev podatkov normalna.

Medsebojno korelacijo parametrov smo preverjali s Spearmanovim koeficientom in Bland-Altmanovim diagramom. Vrednost korelacije je izračunana kot povprečje vseh korelacij in nam pove moč povezave dveh spremenljivk. Z Bland-Altmanovimi diagrami pa ugotovimo, kakšno je ujemanje dveh različno merjenih spremenljivk (47).

Linearno povezavo spremenljivk smo preverili z izrisom grafa linearne funkcije, grafično smo ponazorili tudi povezavo polinoma drugega reda med HYPO-He in %HYPO. Grafe in ROC krivulje smo naredili v programu MedCalc, verzije 14.8.1.

Razlike med posameznimi raziskovalnimi skupinami smo preverjali s testom dveh neodvisnih spremenljivk Mann-Whitney. Uporabili smo 95 % interval zaupanja.

Klinično uporabnost RET-He in HYPO-He smo preverili z ROC analizo in jih primerjali z ROC krivuljami CHr in %HYPO. Mejne vrednosti RET-He in HYPO-He smo določali na podlagi najvišje občutljivosti ob najvišji specifičnosti za posamezen parameter v vsaki raziskovalni skupini.



## 4 REZULTATI

Preiskovane parametre smo določili pri 186 vzorcih (**Preglednica X**, Priloga 2). Preiskovance smo glede na vrednosti krvne slike, parametre vnetja in biokemične parametre, ki so ključni za določitev statusa železa razdelili v tri glavne skupine: zdrave, bolnike s sideropenično anemijo (SDA) in bolnike s kronično ledvično boleznijo (CKD). Zadnjo skupino pa smo razdelili še na tri podskupine, in sicer na bolnike z anemijo brez znakov vnetja in normalnim statusom železa (CKD 1), bolnike z anemijo brez znakov vnetja in pomanjkanjem železa (CKD 2) in bolnike z anemijo z znaki vnetja in normalnim statusom železa (CKD 3).

### 4.1 Raziskovalne skupine s kriteriji

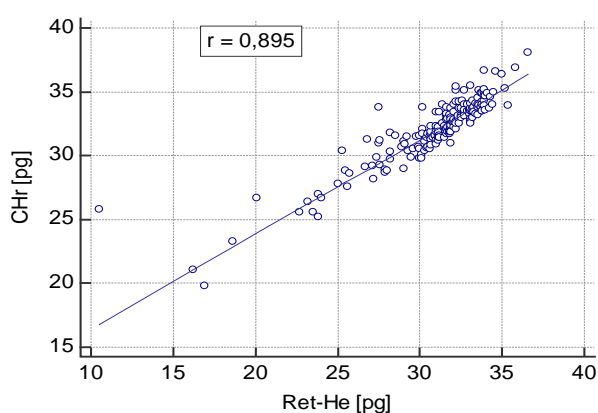
- V skupini zdravih oseb smo analizirali 58 vzorcev polne krvi
- V skupini bolnikov s SDA z izključenim vnetjem ( $CRP \leq 5$  mg/L) smo zbrali 25 vzorcev polne krvi
- V skupini bolnikov s CKD z anemijo ( $Hb < 120$  g/L) smo zbrali 88 vzorcev polne krvi:
  - V skupini CKD 1 (normalni status Fe,  $CRP \leq 5$  mg/L) smo zbrali 50 vzorcev
  - V skupini CKD 2 ( $CRP \leq 5$  mg/L,  $TSAT < 20$  %,  $C_s$  (feritin)  $\leq 200$  µg/L) smo zbrali 7 vzorcev
  - V skupini CKD 3 (normalni status Fe,  $CRP > 5$  mg/L) smo zbrali 31 vzorcev

### 4.2 Porazdelitev podatkov

Porazdelitev raziskovalnih parametrov smo preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov, da bi dokazali normalno porazdelitev parametrov v populaciji. Rezultat testa potrjuje asimetrično porazdelitev parametrov IRF, RET-He, HYPO-He, CHr in %HYPO z vrednostjo  $P < 0,05$ . Logaritemske vrednosti parametrov so porazdeljene normalno pri parametru %HYPO in IRF ( $P > 0,05$ ). Asimetrična porazdelitev je značilno levostranska pri HYPO-He, medtem ko je pri RET-He, IRF in CHr značilna desnostranska asimetrična porazdelitev.

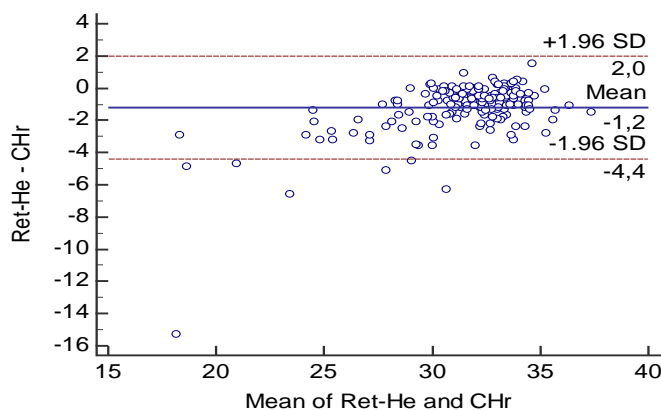
### 4.3 Korelacija med retikulocitnima parametroma ocene količine hemoglobina v retikulocitih

Zanimalo nas je, kakšna je korelacija med retikulocitnima parametroma RET-He in CHr. Preverili smo, če je povezava parametrov RET-He in CHr linearna za vse zbrane vzorce (Slika 3) in znotraj posameznih raziskovalnih skupin. Korelacijo med parametroma za vse vzorce smo določili s Spearmanovim koeficientom ( $r$ ), ki določi moč ujemanja dveh linearno povezanih spremenljivk. Spearmanov koeficient 0,895 potrjuje zelo dobro korelacijo, ki so jo potrdile že predhodne študije (21).



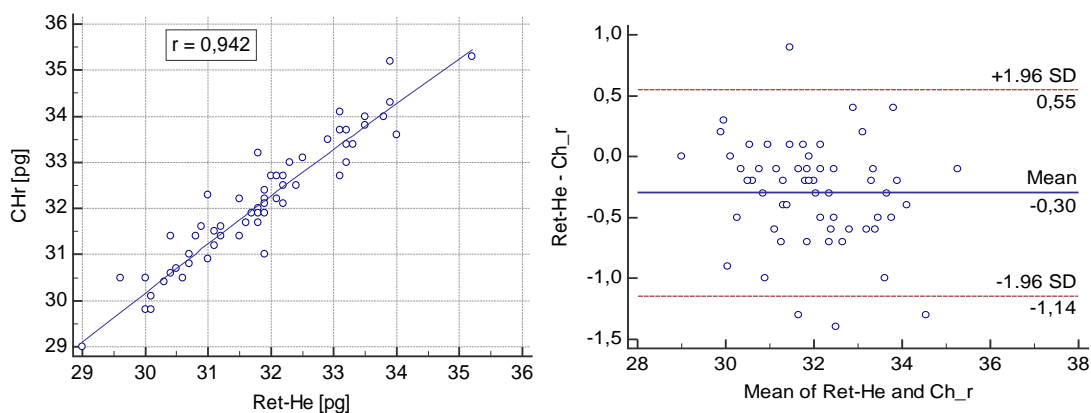
Slika 3: Korelacija RET-He in CHr. Vsi vzorci (N = 186).

Bland-Altmanov diagram prikazuje razlike med meritvami RET-He in CHr (Slika 4). Večina razlik naših meritev je znotraj območja  $\pm 2$  SD. Posamezne vrednosti izven  $\pm 2$  SD so se pojavile pri koncentraciji  $< 30$  pg (z izjemo ene), kar nakazuje na večje razlike med RET-He in CHr pri nižjih vrednostih parametrov. Tudi Bland-Altmanov diagram je potrdil dobro ujemanje parametrov RET-He in CHr.



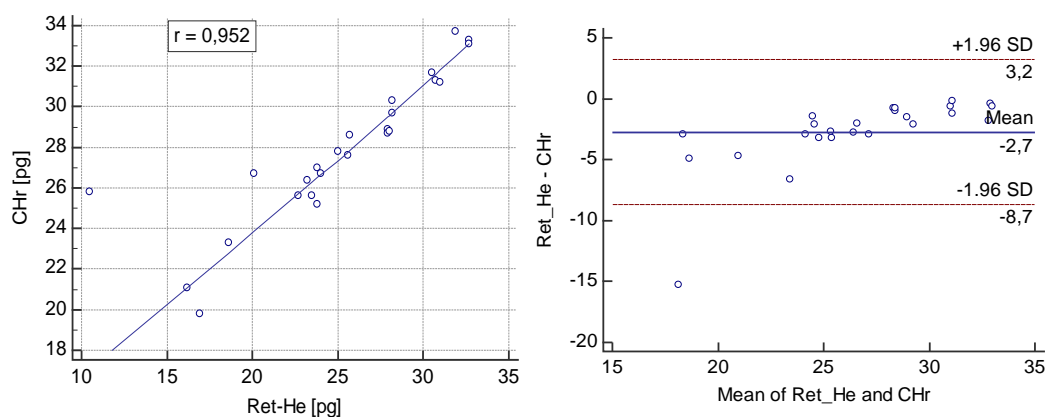
Slika 4: Bland-Altmanov diagram RET-He in CHr. Vsi vzorci (N = 186).

Še boljšo korelacijo med RET-He in CHr smo ugotovili pri zdravih osebah. Spearmanov koeficient korelacije pri zdravih osebah je 0,942. Dobro ujemanje obeh parametrov pri zdravih osebah potrjuje tudi Bland-Altmanov diagram (**Slika 5**).



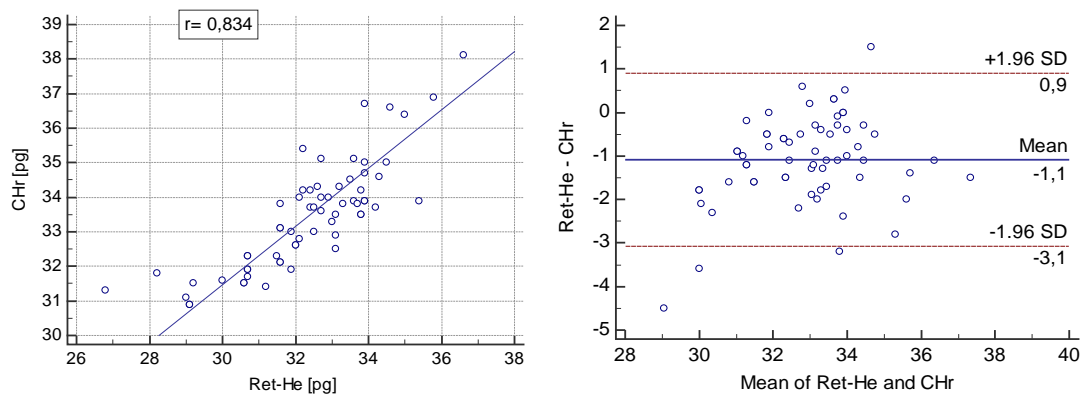
**Slika 5: Korelacija RET-He in CHr. Zdrave osebe (N = 58). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram.**

Linearno odvisnost RET-He in CHr pri bolnikih s SDA prikazuje spodnji graf. Spearmanov koeficient korelacije med RET-He in CHr je 0,952. Tudi Bland-Altmanov diagram potrjuje dobro ujemanje rezultatov RET-He in CHr pri bolnikih s SDA (**Slika 6**).



**Slika 6: Korelacija RET-He in CHr. Bolniki s SDA (N = 25). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram.**

Spodnji graf potrjuje zelo dobro korelacijo med RET-He in CHr tudi pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo. Spearmanov koeficient korelacije je 0,834. Bland-Altmanov diagram prikazuje le nekaj vrednosti izven določenega območja  $\pm 2$  SD (**Slika 7**).

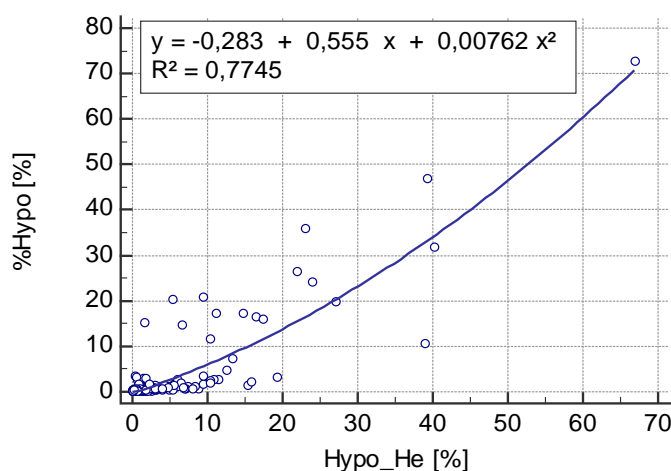


**Slika 7: Korelacija RET-He in CHr. Bolniki s CKD 1, 2 (N = 57). A) Graf odvisnosti parametrov. B) Bland-Altmanov diagram.**

#### 4.4 Korelacija med eritrocitnima parametroma ocene deleža hipohromnih eritrocitov

Zanimalo nas je, kakšna je povezava med HYPO-He in %HYPO ter kolikšna je moč korelacije med parametroma. Želeli smo preveriti navedbe tujih avtorjev, da povezavo med HYPO-He in %HYPO opisuje polinom druge stopnje (32).

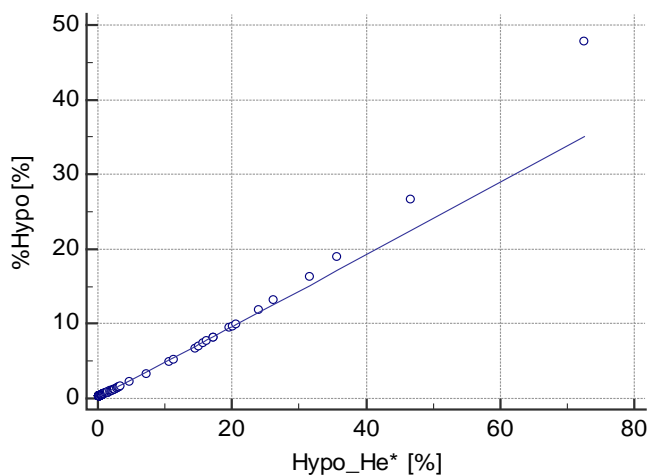
Izrisali smo posamezne grafe glede na testne skupine: vsi vzorci, zdrave osebe, bolniki s SDA, bolniki s CKD (podskupine 1, 2 in 3). Povezavo med HYPO-He in %HYPO za vse testirane vzorce najboljše opiše polinom druge stopnje, katerega enačba je na **sliki 8**.



**Slika 8: Korelacija HYPO-He in %HYPO. Vsi vzorci (N = 186).**

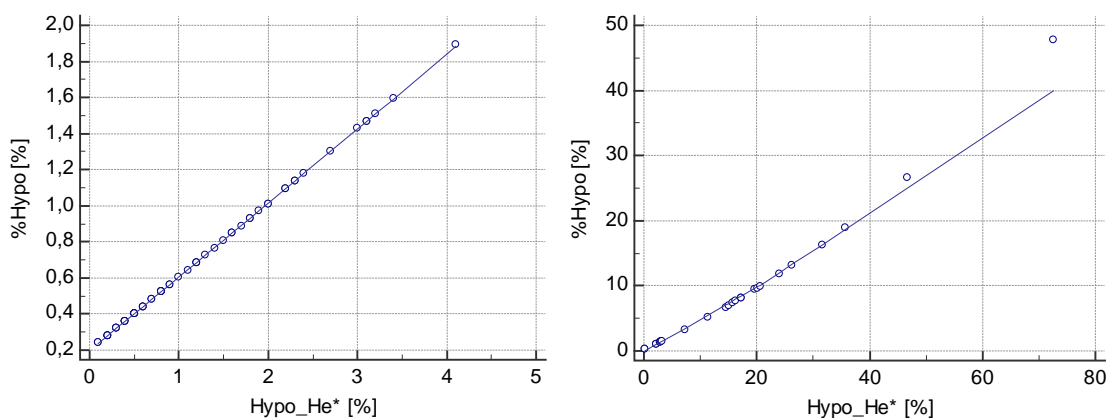
Zanimalo nas je, kakšna je povezava med parametroma, če uporabimo predhodno objavljeno enačbo:  $\text{HYPO-He}^* = 0,2016 + 0,3981 \times \% \text{HYPO} + 0,00356 \times \% \text{HYPO}^2$ . Z izračunano vrednostjo  $\text{HYPO-He}^*$  lahko rezultate primerjamo s  $\% \text{HYPO}$  (32).

Če upoštevamo enačbo drugega reda, ki jo navaja referenca (32), potem dobimo linearno odvisnost (**Slika 9**).



**Slika 9: Linearna povezava med  $\text{HYPO-He}^*$  in  $\% \text{HYPO}$ . Vsi vzorci (N = 186).**

Na enak način smo preverili povezavo tudi za skupino SDA, kjer so bile vrednosti najvišje in za zdrave, kjer so vrednosti najnižje (**Slika 10**). Povezava je zelo dobra, Spearmanov koeficient je v vseh raziskovalnih skupinah blizu 1.



**Slika 10: Linearna povezava med  $\text{HYPO-He}^*$  in  $\% \text{HYPO}$ . A) Zdrave osebe (N = 58). B) Bolniki s SDA (N = 25).**

## 4.5 Eritrocitni in retikulocitni parametri po posameznih skupinah

### 4.5.1 Delež nezrelih retikulocitov

V **preglednici II** so prikazane osnovne statistične značilnosti parametra IRF v testnih skupinah: zdrave osebe, bolniki s SDA in bolniki s CKD.

Srednja vrednost parametra IRF je podana kot mediana, ker je porazdelitev parametra IRF asimetrična. Razpršenost okoli mediane je največja v skupini bolnikov s SDA z absolutnim odklonom mediane 4,2 %.

#### **Preglednica II: Vrednosti IRF po raziskovalnih skupinah**

Raziskovalna skupina	Mediana IRF [%]	95 % CIM [%]
Zdrave osebe	6,4	4,9 – 6,9
Bolniki s SDA	13,0	9,0 – 15,5
Bolniki s CKD	10,3	9,7 – 11,8

CIM = interval zaupanja mediane

### 4.5.2 Količina hemoglobina v retikulocitih

V **preglednici III** so podane osnovne statistične značilnosti parametrov RET-He in CHr v posameznih testnih skupinah.

Povprečne vrednosti parametrov so podane z mediano, saj sta parametra RET-He in CHr porazdeljena asimetrično. Rezultati prikazujejo največjo razpršenost meritev RET-He in CHr v testni skupini bolnikov s SDA, kjer je najnižja vrednost RET-He 10,5 pg in najvišja 32,7 pg ter najnižja vrednost CHr 19,8 pg in najvišja 33,7 pg.

Razpršenost potrjuje tudi absolutni odklon mediane pri parametru RET-He 2,6 pg in 2,2 pg pri parametru CHr.

**Preglednica III: Vrednosti RET-He in CHr po raziskovalnih skupinah**

Raziskovalna skupina	Mediana RET-He [pg]	CIM [pg]	Mediana CHr [pg]	CIM [pg]
Zdrave osebe (n=58)	31,9	31,5 – 32,1	32,1	31,6 – 32,5
Bolniki s SDA (n=25)	25,6	23,5 – 28,2	27,8	26,4 – 29,6
Bolniki s CKD 1 (n=57)	32,7	32,2 – 33,1	33,7	33,1 – 33,9
Bolniki s CKD 2 (n=7)	30,7	29,8 – 33,0	32,3	31,2 – 33,5
Bolniki s CKD 3 (n=31)	30,2	28,1 – 31,3	31,7	30,9 – 33,1

**4.5.3 Delež hipohromnih eritrocitov**

V **preglednici IV** so prikazane osnovne statistične značilnosti HYPO-He in %HYPO v posameznih testnih skupinah. Povprečne vrednosti parametrov so podane z mediano, saj sta parametra HYPO-He in %HYPO porazdeljena asimetrično. Rezultati prikazujejo največjo razpršenost meritev HYPO-He in %HYPO v testni skupini bolnikov s SDA, kjer je najnižja vrednost HYPO-He 0,1 % in najvišja 67,1 % ter najnižja %HYPO vrednost 0,1 % in najvišja 72,5 %. Razpršenost podatkov je največja pri parametrih HYPO-He oziroma %HYPO pri bolnikih s SDA.

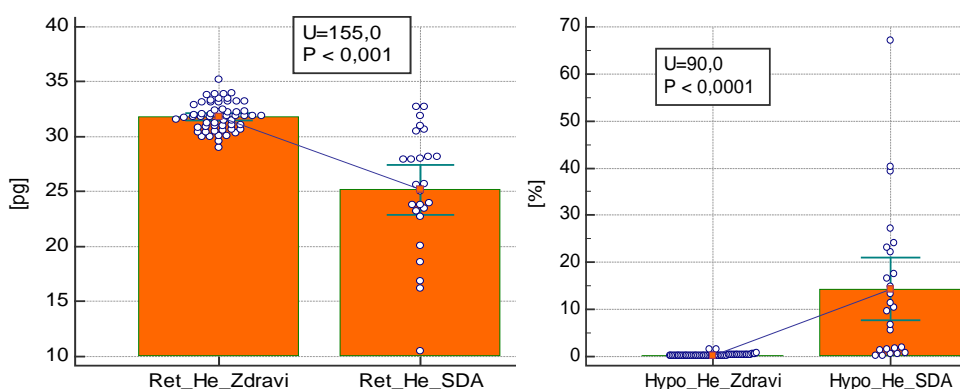
**Preglednica IV: Vrednosti HYPO-He in %HYPO po raziskovalnih skupinah**

Raziskovalna skupina	Mediana HYPO-He [%]	CIM [%]	Mediana %HYPO [%]	CIM [%]
Zdrave osebe (n=58)	0,2	0,1 – 0,2	0,9	0,7 – 1,4
Bolniki s SDA (n=25)	10,5	1,7 – 17,4	15,8	3,8 – 20,0
Bolniki s CKD 1 (n=57)	0,3	0,3 – 0,4	1,4	1,1 – 1,7
Bolniki s CKD 2 (n=7)	0,4	0,2 – 1,9	1,5	0,8 – 6,7
Bolniki s CKD 3 (n=31)	0,8	0,5 – 1,2	5,0	3,5 – 7,2

## 4.6 Primerjava parametrov med testnimi skupinami

Primerjali smo porazdelitev parametrov RET-He in HYPO-He med zdravimi osebami in testnimi skupinami (bolniki s SDA, bolniki s CKD (podskupini 1/2 ter 3). Uporabili smo neparametrični test Mann – Whitney za dve neodvisni spremenljivki. Izbrali smo 95 % interval zaupanja in izrisali grafe. Na vsakem grafu so označene točke posamezne meritve, mediana posamezne testne skupine, 5. in 95. percentil vseh vrednosti v testni skupini ter povezovalna premica, ki označuje razliko med vrednostmi mediane za dve primerjalni skupini. Vrednosti < 5. in > 95. percentila so ekstremne vrednosti.

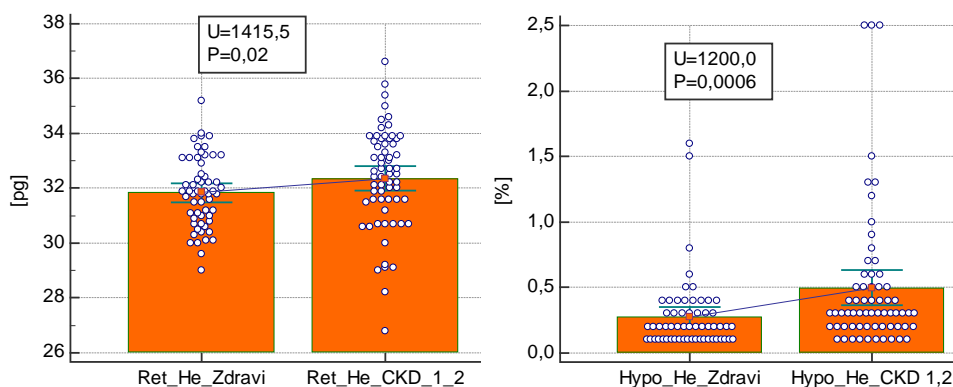
**Slika 11** prikazuje razliko median ter porazdelitev vrednosti posameznih meritev za parametra RET-He in HYPO-He pri zdravih osebah in bolnikih s SDA. Porazdelitev parametrov je statistično različna med skupinama zdravih oseb in bolnikov s SDA ( $P < 0,05$ ).



**Slika 11: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s SDA in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.**

**Slika 12** prikazuje razliko mediane parametra RET-HE in HYPO-He pri zdravih osebah in bolnikih s CKD podskupini 1/2 ter porazdelitev vrednosti parametrov posameznih meritev pri obeh testnih skupinah. Vrednost  $P < 0,05$  potrjuje, da je porazdelitev RET-He in HYPO-He med zdravimi osebami in bolniki s kronično ledvično odpovedjo brez vnetja različna.

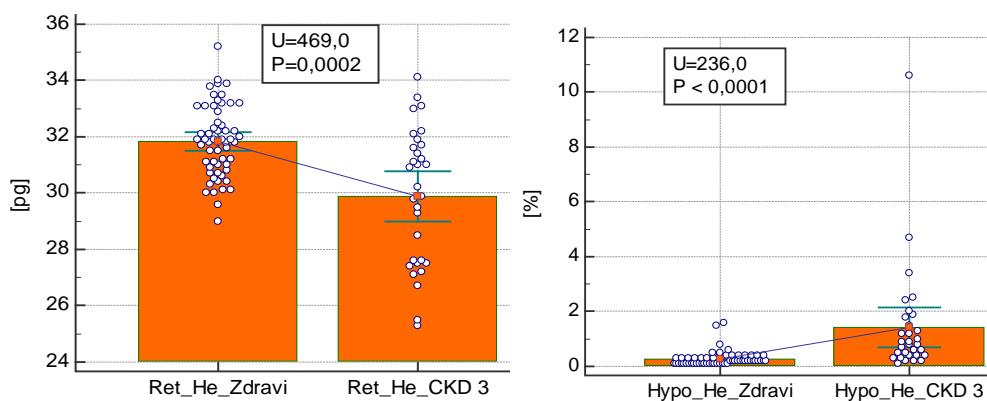




**Slika 12: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s CKD1,2 in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.**

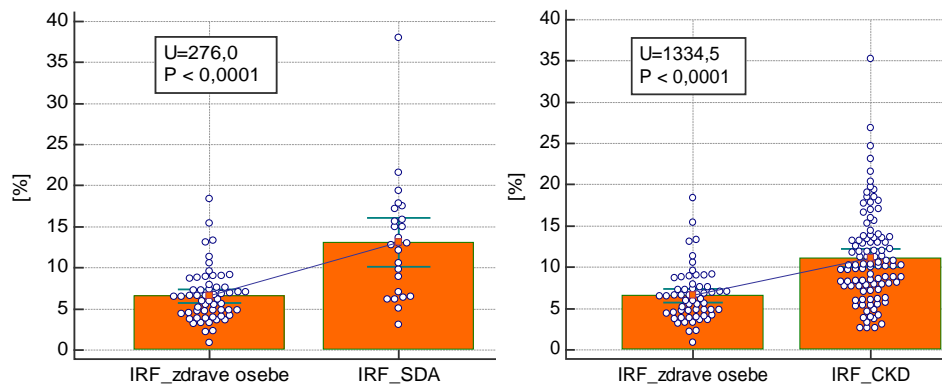
**Slika 13** prikazuje razliko mediane parametrov RET-He in HYPO-He med zdravimi osebami in bolniki s CKD podskupina 3 ter porazdelitev vrednosti parametrov posameznih meritev pri obeh testnih skupinah.

Vrednost  $P < 0,05$  potrjuje, da je porazdelitev RET-He in HYPO-He med zdravimi osebami in bolniki s kronično ledvično odpovedjo in prisotnim vnetjem različna.



**Slika 13: Porazdelitev vrednosti median parametrov pri bolnikih s CKD 3 in zdravih (test Mann-Whitney). A) RET-He. B) HYPO-He.**

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti če obstaja statistično značilna razlika v meritvah IRF med zdravimi osebami in osebami s pomanjkanjem železa. Spodnja grafa prikazujeta (**Slika 14**) porazdelitev podatkov za parameter IRF med skupino zdravih oseb in bolnikov s SDA ter med skupino zdravih oseb in bolnikov s CKD. Uporabili smo neparametrični test Mann-Whitney za oceno razlike med dvema med seboj neodvisnima skupinama.



**Slika 14: Porazdelitev vrednosti parametra IRF pri bolnikih in zdravih (test Mann-Whitney). A) SDA. B) CKD.**

#### 4.7 Določanje mejnih vrednosti eritrocitnih in retikulocitnih parametrov pri sideropenični anemiji in anemiji zaradi kronične ledvične bolezni

Z ROC-analizo smo želeli postaviti mejne vrednosti RET-He, HYPO-He, CHr in %HYPO pri posameznih testnih skupinah.

Pri skupini bolnikov s SDA smo želeli opredeliti mejne vrednosti parametrov, pri katerih lahko ugotovimo, da je pomanjkanje železa pri bolniku prisotno. Pri skupini bolnikov s CKD smo želeli opredeliti mejne vrednosti parametrov, s katerimi bi preverjali uspešnost zdravljenja s pripravki železa in epoetini.

V **preglednici V** so zbrane mejne vrednosti parametrov RET-He in CHr po posameznih testnih skupinah. Površine pod krivuljo (AUC) z občutljivostjo in specifičnostjo so izračunane za oba analizatorja. Največjo diagnostično uporabnost z AUC 0,893 smo dobili pri vrednosti RET-He 28,2 pg, ki v naši raziskavi določa mejno vrednost za oceno pomanjkanja železa pri bolnikih s SDA.

**Preglednica V: Mejne vrednosti RET-He in CHr pri bolnikih z anemijo**

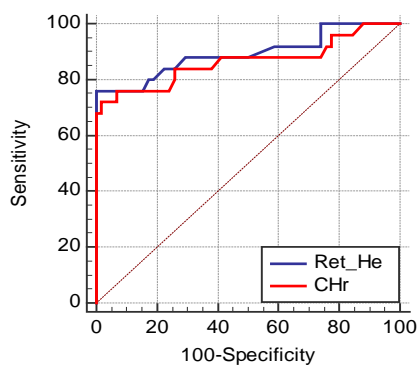
Skupina	Mejna vrednost [%]		AUC [/]		Občutljivost [%]		Specifičnost [%]	
	RET-He	CHr	RET-He	CHr	RET-He	CHr	RET-He	CHr
SDA	< 28,2	< 29,7	0,893	0,865	76	72	100	98
CKD 1, 2	> 32,3	> 32,7	0,619	0,732	54,7	65,6	70,7	70,7
CKD 3	≤ 29,9	≤ 31,2	0,739	0,536	48,4	39	96,6	74

V **preglednici VI** so zbrane mejne vrednosti parametrov HYPO-He in %HYPO glede na testno skupino. Površine pod krivuljo (AUC) z občutljivostjo in specifičnostjo so izračunane za oba analizatorja. Največjo diagnostično uporabnost z AUC 0,938 smo dobili pri mejni vrednosti HYPO-He 1,6 % pri oceni pomanjkanja železa v skupini bolnikov s SDA, največja diagnostična uporabnost %HYPO pa je z AUC 0,884 pri mejni vrednosti 2,3 % pri oceni pomanjkanja železa ob prisotnosti vnetja.

**Preglednica VI: Mejne vrednosti HYPO-He in %HYPO pri bolnikih z anemijo**

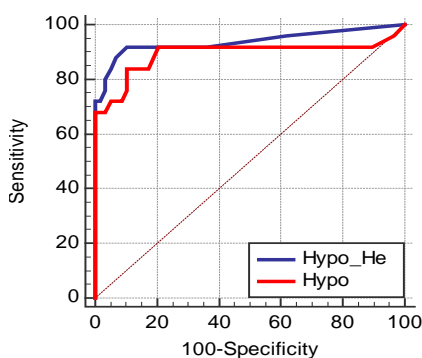
Skupina	Mejna vrednost [%]		AUC [/]		Občutljivost [%]		Specifičnost [%]	
	HYPO-He	%HYPO	HYPO-He	%HYPO	HYPO-He	%HYPO	HYPO-He	%HYPO
SDA	> 1,6	> 2,7	0,938	0,737	72	74	100	90
CKD 1, 2	> 0,2	> 0,9	0,677	0,612	65,6	70,3	63,8	51,7
CKD 3	> 0,4	> 2,3	0,869	0,884	71,0	83,9	89,7	86,2

Površina pod krivuljo (**Preglednica V**) potrjuje večjo diagnostično uporabnost RET-He (modra krivulja, **Slika 15**) v primerjavi s CHr pri oceni pomanjkanja železa v testni skupini bolnikov s SDA.



**Slika 15: ROC krivulji RET-He in CHr pri skupini s SDA.**

Površina pod krivuljo (**Preglednica VI**) prikazuje večjo diagnostično uporabnost HYPO-He (modra krivulja, **Slika 16**) v primerjavi s %HYPO pri oceni pomanjkanja železa v testni skupini bolnikov s SDA.



**Slika 16: ROC krivulji HYPO-He in %HYPO pri skupini s SDA.**

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 Določitev referenčnih intervalov za količino hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov

Referenčni interval je določen kot območje 95 % referenčnih vrednosti pri normalni porazdelitvi, oziroma kot vrednosti 2,5 in 97,5 percentila pri nenormalni porazdelitvi vrednosti (48). Želeli smo preveriti referenčne intervale, ki se uporabljajo v Specializiranem hematološkem laboratoriju pri rutinskem delu. Za RET-He je določen referenčni interval 28 – 35 pg in za HYPO-He < 2,7 % (**Preglednica IX**). Znotraj teh mej je aktivnost eritropoeze in razpoložljivost železa zadostna za proizvodnjo novih normokromnih eritrocitov. Na podlagi vrednosti mediane RET-He in HYPO-He, ki smo jo dobili v tej raziskavi, smo postavili spodnjo referenčno mejo pri 2,5 percentilu in zgornjo referenčno mejo pri 97,5 percentilu vseh vrednosti. Interval, ki ga dobimo, je za parameter RET-He 29,6 – 34,1 pg in za parameter HYPO-He 0,1 – 1,5 %. Iz literature povzeti referenčni interval (21) in ta, ki smo ga določili za RET-He, sta si med seboj podobna. Močno pa se razlikuje referenčni interval za HYPO-He (26). Če rezultate primerjamo z referenčnimi vrednostmi, ki so bile določene v eni od študij (42), vidimo, da je naš rezultat bližje rezultatom te študije, ki je postavila referenčni interval za moške 0,1 – 0,5 % in 0,1 – 1,1 % za ženske.

Če referenčne vrednosti za HYPO-He ločimo po spolu, dobimo referenčni interval 0,1 – 1,6 % pri moških (n = 21) in 0,1 – 1,1 % pri ženskah (n = 37). Zanimivo je, da dobimo višjo mejno vrednost pri moških, čeprav drugi avtorji (42) navajajo višjo mejno vrednost pri ženskah. Na rezultat verjetno vpliva majhna skupina in številčno nesorazmerje med spoloma, saj smo vključili precej več vzorcev žensk kot moških.

Referenčni interval za RET-He so v tej študiji postavili precej višje, 32,1 – 38,8 pg (42). V primerjavi z drugimi raziskavami lahko rečemo, da je naš rezultat (29,6 – 34,1 pg) veliko bolj primerljiv s študijami, ki so postavile referenčne intervale v območju nižjih vrednosti (21). Razlike, ki se pojavijo, so lahko posledica različnih velikosti vzorcev, pomanjkanja podatkov, kako je bila definirana skupina zdravih oseb (na podlagi laboratorijskih meritev, fizičnega pregleda in anamneze) in med-laboratorijskih variacij. Referenčni interval za HYPO-He se dobro ujema z drugimi študijami (26).

Mejna vrednost, ki jo zdaj uporablja Specializiran hematološki laboratorij, je vrednost, pri kateri lahko odkrijemo funkcijsko pomanjkanje železa. Referenčni interval je v tem primeru nesmiselno postaviti nižje od 2,7 %.

Vrednosti večje od 2,7 % kažejo na funkcijsko pomanjkanje železa (32), vrednosti pod to mejno vrednostjo pa lahko kažejo na slabšo učinkovitost eritropoeze v času 120 dni, vendar je količina železa še zadostna za proizvodnjo novih eritrocitov.

Specializiran hematološki laboratorij nima dodatne referenčne meje za absolutno pomanjkanje železa, ki je bila v študijah določena pri vrednostih HYPO-He > 4,5 % (32). Če bi želeli to vrednost določiti na podlagi naših rezultatov, bi potrebovali populacijo bolnikov z absolutnim pomanjkanjem železa. Absolutno pomanjkanje železa je definirano s koncentracijo feritina < 10 µg/L z nasičenostjo transferina < 20 % in koncentracijo hemoglobina < 120 g/L (5, 14). Imeli smo zgolj en primer absolutnega pomanjkanja železa pri bolniku s CKD. Dodatna meja za absolutno pomanjkanje železa tako ni nujno potrebna, saj pri spremljanju bolnikov s pomanjkanjem železa že ob funkcijskem pomanjkanju železa pričnemo z zdravljenjem, da preprečimo simptome anemije. Pri odkrivanju novih bolnikov pa vrednost HYPO-He > 2,7 % potrdi, da je potrebno takega bolnika spremljati in zdraviti z nadomestki železa.

## **5.2 Primerjava dveh načinov določanja količine hemoglobina v retikulocitih**

S pomočjo korelacije smo želeli opredeliti ujemanje dveh načinov merjenja količine hemoglobina v retikulociti (RET-He, CHr), da bi ugotovili kako sta parametra povezana in kolikšna je moč povezave. Z uporabo Kolmogorov-Smirnov testa smo preverjali, ali so vrednosti RET-He in HYPO-He porazdeljene normalno.

Normalna porazdelitev je približek Gaussove porazdelitve s 95 % odstotno porazdelitvijo podatkov okrog aritmetične sredine vseh vrednosti (49). Dokazali smo asimetrično porazdelitev parametrov RET-He in CHr, ki sta porazdeljena asimetrično v desno in asimetrično porazdelitev HYPO-He in %HYPO, ki sta porazdeljena asimetrično v levo. Preverjali smo, ali obstaja linearna povezava med našimi raziskovalnimi parametri. Parametra RET-He in CHr sta med seboj povezana linearno (**Slika 3**), kar so dokazale tudi druge študije (21).

Korelacijo med parametri smo preverjali s Spearmanovim koeficientom, ker parametri niso porazdeljeni normalno. Korelacija med RET-He in CHr je linearna z  $r = 0,895$  (**Slika 3**).

Korelacija je najboljša ( $r = 0,952$ ) pri bolnikih s SDA (**Slika 6**), najslabša pa pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo (**Slika 7**) brez znakov vnetja ( $r = 0,834$ ). Bland-Altmanovi diagrami (**Slika 4**, **Slika 5**, **Slika 6**, **Slika 7**) potrjujejo dobro ujemanje parametrov obeh analizatorjev, kar pomeni, da sta med seboj zelo dobro primerljiva.

### 5.3 Primerjava dveh načinov določanja deleža hipohromnih eritrocitov

S primerjavo dveh načinov določanja ocene deleža hipohromnih eritrocitov smo želeli preveriti ujemanje parametrov HYPO-He in %HYPO, ki se med seboj razlikujeta v drugačnem načinu merjenja zaradi različnih enot. Ugotoviti smo želeli njuno korelacijo, ker je parameter %HYPO vključen v Evropske smernice za spremljanje funkcijskega pomanjkanja železa pri kronični ledvični bolezni (19).

V literaturi so korelacijo med HYPO-He in %HYPO opisali s polinomom druge stopnje (32).

Tudi naši rezultati potrjujejo, da povezavo opisuje polinom drugega reda (**Slika 8**). Tuji avtorji so navedli, da lahko s transformacijo HYPO-He (32) dobimo linearno povezavo z %HYPO, na podlagi katere lažje primerjamo vrednosti parametrov med seboj. Linearno povezavo HYPO-He\* po transformaciji z enačbo (32) smo dokazali v celotni populaciji vseh vzorcev (**Slika 9**) in posamezno v vsaki testni skupini (**Slika 10**). Med seboj smo primerjali dva analizatorja ter dokazali, da so rezultati obeh analizatorjev za navedena parametra primerljivi (**Slika 4**, **Slika 9**). Tako parametra RET-He in HYPO-He omogočata enako ovrednotenje glede na klinično sliko bolnika, kot parametra CHr in %HYPO.

Uporaba eritrocitnih in retikulocitnih parametrov pri oceni pomanjkanja železa je smiselna, saj nam opredelijo tako zgodnje kot pozno pomanjkanje železa.

## 5.4 Določitev referenčnega intervala za delež nezrelih retikulocitov

Uporabnost ocene deleža nezrelih retikulocitov (IRF) smo želeli oceniti pri bolnikih s pomanjkanjem železa. Referenčni interval, ki je postavljen v literaturi, je pri ženskah 1,1 – 15,9 % in pri moških 1,5 – 13,7 % (38). Naše vrednosti parametra IRF so višje pri osebah s pomanjkanjem železa (SDA, CKD) za razliko od zdravih oseb (**Preglednica II**). Če postavimo referenčni interval na podlagi vrednosti 2,5 in 97,5 percentila, dobimo za ženske interval 1,5 – 14,5 % in za moške 2,3 – 18,3 %. Vrednosti so podobne vrednostim tujih avtorjev (38) z izjemo nižjih rezultatov pri ženskah. Na rezultat lahko vpliva nesorazmerna porazdelitev med moškimi (n = 21) in ženskami (n = 37).

Pri bolnikih s sideropenično anemijo so vrednosti parametra IRF v povprečju višje kot pri zdravih osebah (**Preglednica II**). Pri zmernem in hudem pomanjkanju železa ( $Hb \leq 80$  g/L) je značilen porast IRF ( $> 17,5$  %) (**Preglednica X**). V primerjavi z blagim pomanjkanjem železa so vrednosti IRF povečane pri  $Hb \leq 110$  g/L (**Preglednica X**), v ostalih primerih pa so znotraj referenčnega intervala.

Vrednosti IRF pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo so v primerjavi z zdravimi osebami višje, v primerjavi z bolniki s sideropenično anemijo pa je povprečje meritev nižje (**Preglednica II**). To je skladno tudi s podatki o RET-He in HYPO-He, ki dokazujejo, da je pomanjkanje železa pri dializnih bolnikih redko (**Preglednica III**, **Preglednica IV**).

## 5.5 Značilnosti količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri bolnikih z anemijo

Bolnike z anemijo smo razdelili na štiri podskupine, da bi lažje primerjali povprečne vrednosti meritev obeh parametrov med podskupinami. V študijah so dokazali največjo razliko med povprečnimi vrednostmi parametrov RET-He in HYPO-He med zdravimi osebami in bolniki s sideropenično anemijo.

Pri bolnikih s kronično odpovedjo ledvic na hemodializi so študije dokazale manjšo razliko med povprečno vrednostjo RET-He in HYPO-He v primerjavi z zdravimi osebami (30).



**Preglednica VII: Povprečne vrednosti retikulocitnih in eritrocitnih parametrov pri skupinah preiskovancev v primerjavi z literaturnimi podatki (30)**

Skupina	RET-He (30) [pg]	RET-He [pg]	HYPO-He (30) [%]	HYPO-He [%]
Zdravi	33,7 ± 1,5	31,9 ± 1,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
SDA	23,9 ± 4,5	25,6 ± 2,6	18,8 ± 16,2	10,5 ± 9,2
CKD	32,7 ± 4,5	32,0 ± 1,4	2,2 ± 3,6	0,4 ± 0,2

Naši rezultati te ugotovitve potrjujejo, saj smo določili najnižjo povprečno vrednost meritev RET-He pri bolnikih s SDA (RET-He 25,6 ± 2,6 pg). Rezultat prikazuje veliko razpršenost vrednosti RET-He (MAD = 2,6 pg).

Povprečna vrednost parametra HYPO-He je najvišja pri bolnikih s SDA (HYPO-He 10,5 ± 9,2 %) v primerjavi z bolniki s CKD in zdravimi. Podatek kaže, da so bolniki s SDA najbolj izpostavljeni pomanjkanju železa v daljšem časovnem obdobju. Vrednosti RET-He so pri zdravih osebah in bolnikih s CKD podobne. Razlog je v tem, da so bolniki na hemodializi redno laboratorijsko spremljani in se pomanjkanje železa ali anemija takoj ustrezno zdravi. Bolniki s SDA obiščejo zdravnika šele ob slabem počutju in utrujenosti, ko je anemija že v zmerno hudi do hudi obliki, zato so vrednosti RET-He v povprečju nižje.

Vrednosti mediane RET-He pri bolnikih s CKD so znotraj treh skupin zelo podobne (**Preglednica III**). Pomembno je, da rezultate RET-He interpretiramo skupaj s HYPO-He vrednostmi, ki so višje od povprečne vrednosti pri zdravih osebah (**Preglednica IV**).

V študijah so dokazali, da višje vrednosti RET-He, HYPO-He in številčne koncentracije retikulocitov kažejo na dober odgovor bolnikov na zdravljenje z epoetinom in pripravki železa (30). Povprečna vrednost RET-He je bila pri vseh bolnikih s CKD (**Preglednica III**) bližje referenčnemu intervalu za zdrave osebe (29,6 – 34,1 pg) kot povprečni vrednosti parametra pri bolnikih s SDA (25,6 ± 2,6 pg). To kaže na dobro vgradnjo železa v hemoglobin in nakazuje, da eritropoeza ni zavrnjena zaradi morebitne ne-razpoložljivosti železa v kostnem mozgu.

Izjema je skupina CKD 3, kjer je povprečna vrednost RET-He ( $30,2 \pm 1,9$  pg) nižja kot pri ostalih dveh skupinah bolnikov s CKD (**Preglednica III**) zaradi prisotnosti vnetja, ki zavira prenos železa v kri.

Višje povprečne vrednosti HYPO-He ( $0,4 \pm 0,2$  %) v primerjavi z zdravimi osebami ( $0,2 \pm 0,1$  %) kažejo, da je verjetno zmerno funkcijsko pomanjkanje železa prisotno pri vseh bolnikih s CKD. Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da je anemija pri kroničnih bolnikih na hemodializi dobro nadzorovana, saj imamo zgolj en primer absolutnega pomanjkanja železa. V primerjavi z bolniki s SDA je razpoložljivost železa za eritropoezo večja pri bolnikih s CKD. Znatno nižje vrednosti RET-He ( $25,6 \pm 2,6$  pg) in povišane vrednosti HYPO-He ( $10,5 \pm 9,2$  %) pri bolnikih s SDA potrjujejo pomanjkanje železa v daljšem časovnem obdobju.

## 5.6 Mejne vrednosti ocene količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri diagnosticiranju pomanjkanja železa

S pomočjo ROC analize smo določili mejne vrednosti za oceno pomanjkanja železa pri bolnikih s SDA. V študijah so mejne vrednosti RET-He postavljene zelo različno, 27,2 pg (22), 25 pg (23), 29 pg (27) in 29,8 pg (30). Če vzamemo povprečje teh vrednosti dobimo mejno vrednost 27,8 pg. Ta vrednost predstavlja mejo za identifikacijo pomanjkanja razpoložljivega železa.

Naša vrednost 28,2 pg je bila določena s 76 % občutljivostjo in 100 % specifičnostjo (**Preglednica V**). Rezultat smo dobili na podlagi primerjave vrednosti RET-He pri bolnikih s SDA in pri zdravih. Sklenemo lahko, da so vrednosti nižje od 28,2 pg v 76 % odraz trenutnega pomanjkanja železa za učinkovito eritropoezo. Mejna vrednost je glede na referenčni interval RET-He zelo blizu spodnje referenčne meje (29,6 – 34,1 pg). Na rezultat vpliva tudi različna stopnja anemije pri bolnikih. Če bi imeli v skupini bolnikov s SDA večino bolnikov z zelo nizkim hemoglobinom in hudo anemijo ( $< 80$  g/L), bi bila mejna vrednost precej nižja. Površina pod krivuljo 0,893 (**Preglednica V**) potrjuje dobro uporabnost mejne vrednosti pri odkrivanju pomanjkanja železa.

Primerjava ROC krivulj (**Slika 15**) za RET-He in CHr kaže na malenkost večjo diagnostično uporabnost RET-He v primerjavi s CHr.

Mejna vrednost CHr 29,7 pg pomeni 72 % občutljivost in 98 % specifičnost pri odkrivanju pomanjkanja železa, vrednost površine pod krivuljo je 0,865 (**Preglednica V**). Dokazali smo, da sta vrednosti RET-He  $< 28,2$  pg in CHr  $< 29,7$  pg uporabni pri ugotavljanju trenutnega pomanjkanja železa za učinkovito eritropoezo in diagnosticiranju sideropenične anemije.

Mejno vrednost HYPO-He smo postavili pri 1,6 %. Vrednosti nad 1,6 % so v naši raziskavi v 72 % odstotkih napovedovale pomanjkanje železa v obdobju treh mesecev. Specifičnost testa je bila 100 %, kar pomeni, da rezultat HYPO-He  $> 1,6$  % vedno napoveduje pomanjkanje železa in neučinkovito eritropoezo v preteklem obdobju 120 dni. Površina pod krivuljo 0,938 odraža dobro diagnostično uporabnost HYPO-He (**Preglednica VI**). V primerjavi s %HYPO je HYPO-He boljši diagnostični kazalec pomanjkanja železa za eritropoezo (**Slika 16**). Mejna vrednost %HYPO 2,7 % je bila določena s 74 % občutljivostjo in z 90 % specifičnostjo. Površina pod krivuljo je 0,894.

Po priporočilih sta mejni vrednosti CHr  $< 29$  pg in/ali %HYPO  $> 10$  % pokazatelj, da je potrebno začeti zdravljenje z železom (13). Potrdimo lahko, da je vrednost CHr  $< 29,7$  pg (**Preglednica V**) indikator pomanjkanja železa za učinkovito eritropoezo, vrednosti %HYPO  $> 2,7$  % (**Preglednica VI**) pa nakazujejo na dlje trajajoče pomanjkanje železa v krvi. V smernicah parametrov RET-He in HYPO-He še niso vpeljali kot diagnostična kazalca pomanjkanja železa, čeprav je njuna korelacija in diagnostična uporabnost v primerjavi s CHr in %HYPO dobro podprta z različnimi študijami (21, 23, 28, 31, 32). Potrjujejo jo tudi naši rezultati (**Slika 15**, **Slika 16**).

### **5.7 Mejne vrednosti ocene količine hemoglobina v retikulocitih in deleža hipohromnih eritrocitov pri spremljanju bolnikov s kronično ledvično odpovedjo**

Bolniki s kronično ledvično odpovedjo na nadomestnem zdravljenju s hemodializo so skupina, pri kateri skrbno spremljamo stanje železa v telesu zaradi zdravljenja z epoetinom. Učinke zdravljenja in odzivnost teh bolnikov bi lahko spremljali tudi s parametroma RET-He in HYPO-He.

Odkrivanje pomanjkanja železa je osnovni namen določanja eritrocitnih in retikulocitnih parametrov, pomembno pa je tudi spremljanje odgovora na terapijo.

Zelo pomembno je tudi nadzorovanje ustrezne koncentracije železa v serumu, kajti presežki železa se kopičijo v celicah in vodijo do okvare organov. Anemija pri kronični ledvični odpovedi je lahko posledica same bolezni in se lahko razvije v sideropenično anemijo, lahko pa je prisotna zaradi vnetja (16).

Bolnike smo najprej ločili na dve večji podskupini na podlagi merjenja CRP. Skupina CKD 3 je kazala znake akutnega vnetja z vrednostjo CRP > 5 mg/L. V skupini z vrednostjo CRP ≤ 5 mg/L (CKD 1 in CKD 2) pa smo izločili bolnike z znaki pomanjkanja železa (CKD 2).

Želeli smo ovrednotiti pomen RET-He in CHr pri ugotavljanju učinkov nadomestnega zdravljenja z železom. V literaturi so bile predstavljene naslednje mejne vrednosti (32):

#### **Preglednica VIII: Mejne vrednosti parametrov v literaturi (32)**

Parameter	Mejna vrednost	Občutljivost [%]	Specifičnost [%]
%HYPO	< 5,8 %	45	87
HYPO-He	< 2,7 %	34	87
CHr	> 31,2 pg	47	83
RET-He	> 30,6 pg	45	83

S pomočjo ROC analize smo določili mejno vrednost RET-He 32,3 pg s 54,7 % občutljivostjo in 70,7 % specifičnostjo (**Preglednica V**). Vrednosti RET-He nad 32,3 pg s 54,7 % verjetnostjo napovedo povečano aktivnost eritropoeze ob odsotnosti vnetja, ki je značilna za bolnike zdravljene z epoetini in pripravki železa. Površina pod krivuljo 0,619 kaže slabšo diagnostično uporabnost RET-He v primerjavi s CHr. Njegovo mejno vrednost smo postavili pri 32,7 pg s 65,6 % občutljivostjo in 70,7 % specifičnostjo.

Mejna vrednost HYPO-He je bila določena pri 0,2 % (**Preglednica VI**). Da bi določili mejne vrednosti za oceno sideropenije pri hemodializnih bolnikih, bi potrebovali večji vzorec, zato smo te bolnike vključili v skupino CKD 1. Ocene pomanjkanja železa ne moremo postaviti zgolj na osnovi določitve HYPO-He, saj je specifičnost mejne vrednosti > 0,2 % slaba in imamo veliko lažno pozitivnih rezultatov pri zdravih osebah.

Smiselnost uporabe RET-He in HYPO-He pri oceni aktivnosti eritropoeze ob prisotnosti vnetja smo preverjali v skupini CKD 3. Meritev  $C_s$  (ferritina) je ob prisotnosti vnetja diagnostično neučinkovita, ker je protein akutne faze. Določili smo mejno vrednost RET-He  $\leq 29,9$  pg. Vrednosti pod 29,9 pg v 48 % napovedujejo pomanjkanje železa (**Preglednica V**). Primerjava s parametrom CHr kaže na boljšo diagnostično uporabo RET-He z večjo površino pod krivuljo (AUC=0,739).

Povečano aktivnost eritropoeze lahko določimo pri vrednostih HYPO-He  $> 0,4$  % z 71 % občutljivostjo. Diagnostična uporabnost mejne vrednosti HYPO-He je slabša (AUC=0,869) od %HYPO (AUC=0,884) pri oceni aktivnosti eritropoeze ob prisotnosti vnetja (**Preglednica VI**).

Vrednosti %HYPO višje od 2,3 % nakazujejo na pospešeno eritropoezo v obdobju 120 dni pred meritvijo.

Na podlagi vseh rezultatov lahko zaključimo, da je uporaba parametra RET-He smiselna pri oceni pomanjkanja železa in oceni učinkov zdravljenja z epoetini. Samostojne meritve HYPO-He zaradi slabe diagnostične občutljivosti in specifičnosti ne omogočajo ocene aktivnosti eritropoeze pri bolnikih, ki se zdravijo z železom. Celotna ocena pomanjkanja železa mora biti postavljena na podlagi rezultatov biokemičnih preiskav in rezultatov krvne slike, eritrocitni in retikulocitni parametri pa so lahko pri tem v veliko pomoč.

## 6 ZAKLJUČEK

Naši rezultati so potrdili:

- Zelo dobro korelacijo med retikulocitnima parametroma RET-He in CHr, ki je linearna ( $r = 0,895$ ) (**Slika 3**).
- Povezavo med parametroma HYPO-He in %HYPO opisuje polinom drugega reda (**Slika 8**). Upoštevanje to zvezo je po transformaciji v HYPO-He\* (32) korelacija s %HYPO (**Slika 9**) linearna.
- Diagnostično uporabnost RET-He pri mejni vrednosti 28,2 pg (76 % občutljivost in 100 % specifičnost) za oceno pomanjkanja železa. Diagnostična uporabnost RET-He (AUC=0,893) je pri oceni pomanjkanja železa celo malenkost boljša v primerjavi s CHr (AUC=0,865) (**Preglednica V**).
- Diagnostično uporabnost HYPO-He pri mejni vrednosti 1,6 % z 72 % občutljivostjo in 100 % specifičnostjo za oceno pomanjkanja železa. Diagnostična uporabnost HYPO-He (AUC=0,938) je pri oceni pomanjkanja železa celo nekoliko višja v primerjavi z %HYPO (AUC=0,737) (**Preglednica VI**).
- Smiselnost uporabe RET-He in HYPO-He v kombinaciji s klasičnimi biokemijskimi kazalci pri spremljanju bolnikov s kronično ledvično odpovedjo na hemodializi za oceno potrebe po nadomeščanju železa ob zdravljenju z epoetini, pri čemer prisotnost akutnega vnetja (CRP > 5 mg/L) ne vpliva na meritve RET-He in HYPO-He.

## 7 LITERATURA

- 1) Greer P J, Arber A D, Glader B, List F A, Means T R, Paraskevas F, Rodgers M G: Wintrobe's clinical hematology, 13<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 587-8.
- 2) Aapro M, Österborg A, Gascón P, Ludwig H, Beguin Y: Prevalence and management of cancer-related anaemia, iron deficiency and the specific role of i.v. iron. *Ann Oncol.* 2012; 23: 1954-62.
- 3) Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4.izdaja, Littera Picta d.o.o. Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 1266-71.
- 4) Umbreit J: Iron deficiency: A concise review. *Am J Hematol.* 2005; 78: 225-31.
- 5) Khan Y, Tisman G: Pica in iron deficiency: a case series. *J Med Cases.* 2010; 4: 86.
- 6) Osman M Y, Wali A Y, Osman M O: Craving for ice and iron deficiency anemia: a case series from Oman. *Pediatr Hematol Oncol.* 2005; 22: 127-31.
- 7) Poskitt M. E. E: Early history of iron deficiency. *Br J Haematol.* 2003; 122: 554-62.
- 8) Haldar K, Mohandas N: Malaria, erythrocytic infection, and anemia. Dostopno na: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2009/1/87.long> [online 7.2.2015].
- 9) Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R: Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19: 164-74.
- 10) Cohen R, Stixrude L: Crystal at the Centre of the Earth. Dostopno na: [http://www.psc.edu/science/Cohen\\_Stix/cohen\\_stix.html](http://www.psc.edu/science/Cohen_Stix/cohen_stix.html) [online 6.7.2014].
- 11) Cullis O. J: Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br J Haematol.* 2011; 154: 289-300.
- 12) Ganz T, Nemeth E: The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. Dostopno na: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2011/1/538.long> [online 7.2.2015].
- 13) Urrechaga E, Borque L, Escanero F J: Biomarkers of hypochromia. The contemporary assessment of iron status and erythropoiesis. Dostopno na: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/603786/> [online 20.2.2015].

- 14) Reinisch W, Staun M, Bhandari S, Muñoz M: State of iron: How to diagnose and efficiently treat iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2012; 7: 429-40.
- 15) Splošna bolnišnica Brežice: Klinična pot pri anemijah. Dostopno na: [http://www.sb-brezice.si/db/uploads/dokumenti/Kp\\_pri\\_anemijah.pdf](http://www.sb-brezice.si/db/uploads/dokumenti/Kp_pri_anemijah.pdf) [online 30.9.2014].
- 16) Regil M L (WHO): Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency. Dostopno na: [http://www.who.int/vmnis/indicators/serum\\_ferritin.pdf](http://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin.pdf). [online 15.8.2014].
- 17) Theurl I, Therul M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Wurzl E, Weiss G: Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2009; 113: 5277-8.
- 18) Thomas C, Kirschbaum A, Boehm D, Thomas L: The diagnostic plot: a concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. *Med Oncol*. 2006; 23: 23-36.
- 19) Thomas W D, Hincliffe F R, Briggs C, Macdougall C I, Littlewood T, Cavill I: Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol*. 2013; 161: 639-48.
- 20) Buttarello M, Temporin V, Ceravolo R, Faroma G, Bulian P: The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100. *Am J Clin Pathol*. 2004; 121: 489-495.
- 21) Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Marcus T, Thomas C: Reticulocyte hemoglobin measurement-comparison of two methods in diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43: 1193-202.
- 22) Brugnara C, Schiller B, Moran J: Reticulocyte hemoglobin equivalent and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haem*. 2006; 28: 303-8.
- 23) Canals C, Remacha F A, Sardá P M, Piazzuelo M J, Royo T M, Romero A M: Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter-reticulocyte hemoglobin equivalent-in the diagnosis of anemia. *Hematologica*. 2005; 90: 1133-4.
- 24) Karagülle M, Gündüz E, Akay O M: Clinical significance of reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency anemia. *Turk J Haematol*. 2013; 30: 153-6.
- 25) Kim M J, Ihm H C, Kim J H: Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int J Lab Hemtol*. 2008; 30: 46-52.



- 26) Urrechaga E, Borque L, Escanero F J: Potential utility of the new Sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 1411-6.
- 27) Urrechaga E, Borque L, Escanero F J: Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hemtol.* 2011; 33: 33-44.
- 28) Miwa N, Akiba T, Kimata N, Hamaguchi Y, Arakawa Y, Tamura T, Nitta K, Tsuchiya K: Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. *Int J Lab Hemtol.* 2010; 32: 248-55.
- 29) Joosten E, Lioen P, Brusselmans C, Indevuyst C, Boeckx N: Is analysis of reticulocyte haemoglobin equivalent a useful test for the diagnosis of iron deficiency anaemia in geriatric patients?. *Eur J Intern Med.* 2013; 24: 63-6.
- 30) Urrechaga E, Borque L, Escanero F J: Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hemtol.* 2013; 35: 144-9.
- 31) Maconi M, Cavalca L, Danise P, Cardearelli F, Brini M: Erythrocyte and reticulocyte indices in iron deficiency in chronic kidney disease: comparison of two methods. *Scan J Clin Lab Invest.* 2009; 69: 365-70.
- 32) Buttarello M, Pajola R, Novello E, Rebeschini M, Cantaro S, Oliosi F, Naso A, Plebani M: Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133: 949-54.
- 33) Bovy C, Tsobo C, Crapanzano L, Rprive G, Beguin Y, Albert A, Paulus M J: Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999; 56: 1113-9.
- 34) Urrechaga E, Borque L, Escanero F J: Percentage of hypochromic erythrocytes as a potential marker of iron availability. *Clin Chem Lab Med.* Apr 2012; 50: 685-7.
- 35) Rehu M, Ahonen S, Punnonen K: The diagnostic accuracy of the percentage of hypochromic red blood cells (%HYPOm) and cellular hemoglobin in reticulocytes (CHr) in differentiating iron deficiency anemia and anemia of chronic diseases. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 1809-13.
- 36) Brugnara C: Iron deficiency and erythropoiesis: New diagnostic approaches. *Clin Chem.* 2003; 49: 1573-8.

- 37) Van Wyck B D, Alcorn H, Gupta R: Analytical and biological variation in measures of anemia and iron status in patients treated with maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2010; 56: 540-6.
- 38) Sysmex corporation: Reticulocytes and their significance. Dostopno na: [http://www.sysmex.co.za/files/articles/Xtra\\_online\\_reticulocytes.pdf](http://www.sysmex.co.za/files/articles/Xtra_online_reticulocytes.pdf) [online 27.11.2014].
- 39) Matsushita H, Tanaka Y, Sakairi K, Tanaka Y: Clinical case report vol. 1. Dostopno v Specializiranem hematološkem laboratoriju.
- 40) Sysmex corporation: Reshaping compact automation. Dostopno na: [https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN\\_Compact\\_Automation\\_MKT-10-1175.pdf](https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN_Compact_Automation_MKT-10-1175.pdf). [online 26.8.2014].
- 41) Sysmex Europe: Professional services. Dostopno na: <http://www.sysmex-europe.com/products/diagnostics/haematology/xn-series/professional-services.html>. [online 26.8.2014].
- 42) Pekelharing M J, Hauss O, Jonge de R, Lokhoff J, Sodikromo J, Spaans M, Brouwer R, Lathouder de S, Hinzmann R: Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. Dostopno na: [http://www.sysmex.se/fileadmin/media/f100/Diagnostic\\_Perspectives/Pekelharing\\_DiagPersp\\_Vol1\\_1-11.pdf](http://www.sysmex.se/fileadmin/media/f100/Diagnostic_Perspectives/Pekelharing_DiagPersp_Vol1_1-11.pdf) [online 19.9.2014].
- 43) Sysmex corporation: Navodila za uporabo XN serije 2010-2013. Dostopno v Specializiranem hematološkem laboratoriju.
- 44) Onkodin: PLT-O. Dostopno na: [www.hemato-images.eu](http://www.hemato-images.eu) [online 4.1.2015].
- 45) Preložnik-Zupan I, Lenart K: Klinični pomen novih metod (količina hemoglobina v retikulocitih in hipokromni eritrociti) za oceno pomanjkanja železa v telesu. *Zdrav Vestn.* 2004; 73: 499-502.
- 46) Advia ® 120 hematology system. Dostopno na: <https://www.google.si/search?newwindow=1&client=firefox-a&rls=org.mozilla:sl:official&channel=sb&q=advia+120+reagents&revid=402639595&sa=X&ei=7vYNVP3wDoaCzAON84DoBA&ved=0CHAQ1QIoAg&biw=1427&bih=776>. [online 8.9.2014].
- 47) Bland M J, Altman G D: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Dostopno na:

<http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/hanley/tmp/Surveys/ba.pdf> [online 10.10.2014].

- 48) Skitek M: Najpogostejše laboratorijske preiskave in njihove orientacijske referenčne vrednosti v klinični praksi. Dostopno na: <http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/0a3bd1df2e66c9c75385ab17ed124de8.pdf> [online 3.4.2015]
- 49) Bland MJ, Altman G D: The normal distribution. *Brit Med J.* 1995; 310: 298.

Priloga I:**Preglednica IX: Referenčne vrednosti Specializiranega hematološkega laboratorija**

PARAMETER	REFERENČNI INTERVAL
LKC ( $10^9/L$ )	3,7-9,5 (moški) 3,9-11,1 (ženske)
Hb (g/L)	133-167 (moški) 118-148 (ženske)
Ht (/)	0,39-0,50 (moški) 0,36-0,44 (ženske)
ERCI ( $10^{12}/L$ )	4,32-5,66 (moški) 3,88-4,99 (ženske)
PVE (fL)	82-98
PHE (pg)	27,3-32,6
PKHE (g/L)	316-349
KVVE (%)	9,9-15,5
RET (%)	0,4-2,5
RET-He (pg)	28-35
HYPO-He (%)	< 2,7
TBC	157-384
PVT (fL)	6,5-11,6

## Priloga 2:

## Preglednica X: Demografski podatki in rezultati meritev za vse preiskovane vzorce

ZAPOREDNA ŠT.	STAROST [leta]	SPOL	HGB [g/L]	RET-He [pg]	CHr [pg]	HYPO-He [%]	%HYPO [%]	IRF [%]	CRP [mg/L]
<b>ZDRAVI</b>									
1	65	M	156	33,3	33,4	0,1	0,4	7,4	< 5
2	82	Ž	135	31	32,3	0,3	1,3	7,6	< 5
3	28	Ž	138	30	29,8	0,4	1,5	6,2	< 5
4	54	Ž	124	30,3	30,4	0,1	1,7	7,9	< 5
5	59	M	140	30,7	30,8	0,2	2,2	6,7	< 5
6	59	M	157	31,1	31,5	0,1	1,2	5,9	ND
7	59	Ž	135	31,5	32,2	0,1	0,8	6,6	< 5
8	62	M	147	31	30,9	0,2	1,6	4,5	ND
9	40	M	153	31,8	31,9	0,1	0,6	6,5	ND
10	89	Ž	138	32,1	32,7	0,3	1,9	9	ND
11	46	Ž	128	30,7	31	0,1	1,2	3,6	ND
12	62	Ž	125	31,9	32,2	0,2	3,1	4,8	ND
13	72	Ž	139	30,1	30,1	0,1	1,8	3,9	ND
14	31	Ž	119	30,6	30,5	0,3	2	8,8	ND
15	55	M	160	30,4	31,4	0,4	2,3	18,4	< 5
16	27	Ž	135	32,2	32,5	0,1	0,2	10,6	5
17	32	Ž	134	30,9	31,6	0,1	0,7	7	ND
18	39	Ž	132	31,9	31,9	0,2	0,5	4,7	< 5
19	38	Ž	133	30,8	31,4	0,3	0,9	3,8	ND
20	64	M	142	31,8	33,2	0,1	0,2	3,6	ND
21	72	Ž	128	33,1	32,7	0,1	2	6,8	< 5
22	35	Ž	136	31,2	31,4	0,1	0,5	6,6	ND
23	28	Ž	134	30,5	30,7	0,3	1	0,9	ND
24	29	Ž	122	32,5	33,1	0,1	0,1	4	ND
25	35	Ž	136	33,1	33,7	0,1	0,4	5,2	ND
26	25	M	158	31,7	31,9	0,2	0,4	4,8	< 5
27	66	Ž	126	34	33,6	0,2	0,6	9,6	< 5
28	56	M	160	33,2	33,7	0,2	0,2	2,3	ND
29	37	M	137	31,9	31	0,8	3	13,1	ND
30	84	Ž	124	31,9	32,1	0,2	1,6	11,4	< 5
31	59	Ž	131	32	32,7	0,3	1,4	4,8	ND
32	29	M	149	32,4	32,5	0,4	0,5	7	ND
33	75	Ž	135	31,9	32,4	0,4	3,1	9	< 5
34	51	Ž	128	30	30,5	0,2	1,2	6,9	< 5
35	68	Ž	131	30,1	29,8	0,1	2,2	8,7	ND
36	80	Ž	135	33,2	33,4	0,4	2,7	15,4	ND
37	78	Ž	130	33,5	33,8	0,2	0,7	5,9	< 5
38	47	Ž	138	33,1	34,1	1,5	0,9	2,2	< 5

ZAPOREDNA ŠT.	STAROST [leta]	SPOL	HGB [g/L]	RET-He [pg]	Chr [pg]	HYPO-He [%]	%HYPO [%]	IRF [%]	CRP [mg/L]
39	73	Ž	121	29	29	0,4	2,4	6,6	< 5
40	44	M	163	33,9	35,2	0,4	1,1	9,2	< 5
41	47	M	144	31,8	32	0,1	0,8	7,3	< 5
42	48	Ž	133	33,5	34	0,2	0,5	5,5	ND
43	39	Ž	123	31,6	31,7	0,1	0,5	4,7	< 5
44	84	Ž	127	29,6	30,5	0,4	3,4	4,2	< 5
45	24	M	150	32,9	33,5	0,1	0,3	7,3	< 5
46	38	Ž	127	33,8	34	0,5	0,6	4,4	ND
47	70	M	131	32,2	32,7	0,3	1,8	8,9	< 5
48	34	M	160	31,5	31,4	0,1	0,8	4,9	< 5
49	61	M	142	30,4	30,6	1,6	2,3	3,3	ND
50	44	M	157	35,2	35,3	0,2	0,4	6,5	ND
51	26	Ž	138	32,1	32,2	0,2	0,8	5,6	< 5
52	63	Ž	137	31,1	31,2	0,6	3,2	3,3	ND
53	79	Ž	143	31,8	31,7	0,5	4,1	13,3	ND
54	45	M	138	32,3	33	0,2	0,3	4,1	< 5
55	44	M	154	32,2	32,1	0,1	0,8	7,6	< 5
56	46	M	147	31,2	31,6	0,1	0,2	3,9	< 5
57	24	Ž	139	33,9	34,3	0,1	0,1	3,2	< 5
58	49	Ž	144	33,2	33	0,2	0,3	5,5	< 5
<b>SDA</b>									
59	44	Ž	114	23,5	25,6	5,5	20,1	8,9	< 5
60	45	Ž	101	25	27,8	6,7	14,5	12,8	< 5
61	35	Ž	98	28,2	29,7	14,8	17,2	13	< 5
62	50	Ž	116	23,8	27	10,5	11,4	9,8	< 5
63	66	M	74	23,2	26,4	1,7	15	21,6	< 5
64	72	Ž	72	16,9	19,8	39,3	46,7	17,8	< 5
65	30	Ž	105	30,7	31,3	0,1	0,1	5,1	< 5
66	43	Ž	117	27,9	28,7	0,8	2,2	6,2	< 5
67	49	Ž	92	22,7	25,6	11,3	17,2	17,2	< 5
68	76	M	103	32,7	33,1	1,3	2,2	7	< 5
69	81	Ž	109	31	31,2	0,5	3,2	15	< 5
70	30	Ž	100	25,7	28,6	13,4	7,2	15,6	< 5
71	41	Ž	41	20,1	26,7	67,1	72,5	38	< 5
72	25	Ž	95	23,8	25,2	9,6	20,6	12,1	< 5
73	19	Ž	99	28,2	30,3	16,6	16,3	6,2	< 5
74	52	Ž	97	25,6	27,6	17,5	15,8	15,9	< 5
75	37	Ž	86	16,2	21,1	40,3	31,6	13,7	< 5
76	67	M	105	10,5	25,8	24,1	24	17,5	< 5
77	33	Ž	96	24	26,7	27,2	19,7	13	< 5
78	29	Ž	107	27,9	28,9	1,5	2,9	6,4	< 5
79	29	Ž	80	18,6	23,3	23,2	35,7	19,4	< 5

ZAPOREDNA ŠT.	STAROST [leta]	SPOL	HGB [g/L]	RET-He [pg]	Chr [pg]	HYPO-He [%]	%HYPO [%]	IRF [%]	CRP [mg/L]
80	46	Ž	107	31,9	33,7	22,1	26,3	10,6	< 5
81	88	Ž	99	30,5	31,7	1,9	2,9	6,5	< 5
82	38	Ž	117	32,7	33,3	0,2	0,2	3,1	< 5
83	81	Ž	92	28	28,8	0,6	3	15	< 5
<b>CKD brez anemije</b>									
84	73	M	127	30,3	31,1	0,3	1,4	21,6	7
85	56	M	152	33,5	33,2	0,1	0,3	17	9
86	58	M	126	30,2	32,1	0,8	4,4	14,4	22
87	57	M	137	31,6	33,3	0,8	5,4	13,7	< 5
88	67	M	140	32,3	33,1	0,2	1,6	13,5	5
89	72	Ž	123	34,4	34	0,2	0,5	13,5	6
90	84	Ž	124	31,7	32,2	0,4	0,8	8,5	< 5
91	67	M	142	34	34,7	0,2	0,5	8,4	< 5
92	64	M	123	33,7	34,9	0,6	0,8	8,3	< 5
93	83	M	128	33,4	33,3	0,1	1,2	7,9	5
94	66	M	128	30,2	33,8	3,1	19,4	5,4	15
95	88	M	123	33,8	34,9	0,2	2	5,3	< 5
96	80	M	121	31,4	32,5	0,2	1,5	2,6	< 5
97	62	M	120	31,1	31,9	0,9	6,1	13	56
98	59	M	120	28,9	30,7	0,4	1,2	11,2	5
<b>CKD 1</b>									
99	45	Ž	118	31,9	33	0,2	1,6	10,4	< 5
100	53	M	97	29,2	31,5	0,3	1,9	17	< 5
101	57	M	118	26,8	31,3	2,5	11	17,9	< 5
102	60	Ž	116	33,7	33,8	0,3	1,2	8,8	< 5
103	55	M	110	29	31,1	0,8	1,9	13,4	< 5
104	47	M	93	33,1	32,9	0,2	0,3	8,4	< 5
105	74	Ž	107	32,7	35,1	0,4	8,9	24,7	< 5
106	68	M	96	31,6	32,1	0,6	1,5	14	< 5
107	47	Ž	116	33	33,3	0,5	1,7	10,1	< 5
108	50	M	111	33,3	33,8	0,3	0,7	13,7	< 5
109	75	Ž	104	33,1	33,5	0,5	2,3	10,3	< 5
110	59	M	106	31,9	31,9	0,2	0,2	3,1	< 5
111	83	Ž	104	33,9	34,7	0,1	1,4	8,5	< 5
112	86	Ž	114	32,2	35,4	1	4,9	16,6	< 5
113	71	M	114	34,2	33,7	0,2	0,6	6,3	< 5
114	66	Ž	105	34,6	36,6	0,3	1,7	13,8	< 5
115	64	M	105	31,2	31,4	0,2	0,2	7,1	< 5
116	75	Ž	99	31,6	33,8	0,4	2	3,8	< 5
117	72	M	112	33,2	34,3	0,6	1,3	6	< 5
118	65	Ž	110	31,5	32,3	0,3	1,6	7,9	< 5
119	58	Ž	111	33,8	34,2	0,1	0,3	4,6	< 5

ZAPOREDNA ŠT.	STAROST [leta]	SPOL	HGB [g/L]	RET-He [pg]	Chr [pg]	HYPO-He [%]	%HYPO [%]	IRF [%]	CRP [mg/L]
120	59	Ž	98	34,5	35	0,1	0,2	5,4	< 5
121	70	Ž	109	32,2	34,2	0,9	8,4	12,9	5
122	78	M	107	36,6	38,1	0,2	0,4	12	< 5
123	78	Ž	109	32,7	33,6	0,2	1,1	7,7	< 5
124	63	M	115	30	31,6	0,3	2	5,3	< 5
125	67	M	105	32,1	32,8	0,1	2,6	13	< 5
126	63	Ž	106	33,8	33,5	0,1	0,4	11,2	< 5
127	48	Ž	110	32,4	33,7	0,2	1,8	8,8	< 5
128	55	Ž	96	32,6	34,3	0,4	0,8	7,7	< 5
129	83	Ž	105	33,6	35,1	0,1	0,7	10,8	< 5
130	72	M	112	35	36,4	0,4	1,2	15,7	< 5
131	66	M	115	32,4	34,2	0,3	1,3	10,8	< 5
132	65	Ž	95	33,6	33,9	0,1	1	7,2	< 5
133	80	Ž	117	32,1	34	0,3	1,1	6,2	< 5
134	78	Ž	100	32,5	33	0,6	0,5	3,9	< 5
135	68	M	101	28,2	31,8	1,5	9,6	17,7	< 5
136	34	Ž	115	32,7	34	0,1	0,9	6,1	< 5
137	82	Ž	102	32,5	33,7	0,7	1,6	2,6	< 5
138	91	Ž	118	35,8	36,9	0,3	0,4	10,6	< 5
139	78	M	91	35,4	33,9	0,5	0,6	4,9	5
140	84	Ž	105	34,3	34,6	0,3	5,5	8,2	< 5
141	61	Ž	95	33,5	34,5	0,1	0,2	2,6	5
142	73	M	101	32,9	34	0,7	4,9	9,8	< 5
143	75	M	105	33,1	32,5	0,1	0,8	12,2	< 5
144	61	Ž	107	30,7	31,7	0,3	1	4	< 5
145	84	Ž	104	31,6	32,1	0,2	3,3	6,1	< 5
146	78	M	100	33,9	36,7	0,4	2,7	10	< 5
147	70	M	108	33,9	35	1,2	3,1	8,3	< 5
148	79	M	96	33,8	33,5	0,2	1,4	13	< 5
<b>CKD 2 (ferritin ≤ 200 µg/L, %TSAT &lt; 20 %)</b>									
149	71	Ž	114	30,7	31,9	0,4	1,1	10,1	< 5
150	70	Ž	111	30,6	31,5	0,5	7,2	13,9	5
151	72	M	105	30,7	32,3	0,3	1,4	10,4	< 5
152	56	Ž	111	33,9	33,9	0,3	0,5	5,7	< 5
153	81	M	117	31,6	33,1	1,3	2,3	8,4	< 5
154	61	M	103	32	32,6	0,2	1,5	7,3	5
155	76	Ž	90	29,1	30,9	2,5	6,1	9,8	< 5
<b>CKD 3</b>									
156	81	M	91	25,5	28,8	2,5	11,6	19,4	180
157	53	Ž	113	29,9	30,7	0,6	1,4	16	55
158	73	M	81	27,5	33,8	10,6	39,1	21,6	12
159	86	M	106	27,1	29,2	1,5	5,6	17,1	7



ZAPOREDNA ŠT.	STAROST [leta]	SPOL	HGB [g/L]	RET-He [pg]	CHR [pg]	HYPO-He [%]	%HYPO [%]	IRF [%]	CRP [mg/L]
160	66	Ž	118	31	33,4	0,9	7,5	35,3	8
161	66	Ž	76	30,2	31,7	0,3	5	18,1	26
162	82	M	103	31	31,9	0,2	2,5	13,9	17
163	72	Ž	96	29,5	29,9	0,8	4,6	8,3	6
164	83	M	89	33,4	34,1	0,4	1,2	12	6
165	87	Ž	113	31,1	32,2	0,9	3,8	11,8	16
166	83	Ž	116	27,6	31,2	1,2	15,5	10,2	15
167	66	M	93	26,7	29,1	2,4	10,4	19,7	10
168	79	Ž	104	32,2	35,1	0,5	7	15,3	7
169	87	Ž	115	33	33,6	0,2	4	9,1	14
170	31	M	98	31,6	32,8	0,1	0,4	10,1	56
171	88	Ž	96	27,5	31	2	15,9	13,2	10
172	23	Ž	116	29,3	30,4	0,6	2,4	7,7	7
173	83	M	96	30,9	31,6	0,2	0,4	3,3	26
174	79	M	101	27,2	28,2	1,8	6,5	18,5	16
175	71	M	113	31,7	32,9	1	4,4	7,8	21
176	77	Ž	95	25,3	30,4	3,4	9,6	14,4	53
177	79	M	76	33,1	35,5	1,3	4,4	26,9	8
178	76	Ž	89	31,4	34	0,8	3	11,2	24
179	88	Ž	109	27,6	29,3	1,9	10,5	13,5	11
180	59	Ž	99	31,9	32,8	0,4	8,2	23,1	10
181	77	Ž	119	31,2	33,4	0,7	6,9	11,3	14
182	83	Ž	98	34,1	34,9	0,3	0,8	9,7	17
183	61	M	110	27,4	29,9	4,7	12,7	11,9	34
184	58	M	90	28,5	31,6	0,5	2,6	9,7	86
185	78	M	110	29,8	31,5	1,2	5,6	13,5	24
186	58	M	103	32,1	33,4	0,4	2,6	10,3	11

ND – ni določeno