

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Miljan M. Savković

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA HEPCIDINA-25 I
ODABRANIH GENETSKIH VARIJANTI U
LEČENJU ANEMIJE KOD PACIJENATA U
TERMINALNOJ BUBREŽNOJ SLABOSTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Miljan M. Savković

**THE IMPORTANCE OF DETERMINING
HEPCIDIN-25 AND SELECTED GENETIC
VARIANTS FOR TREATING ANEMIA IN
PATIENTS WITH END-STAGE RENAL
DISEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI:

Dr sc. Violeta Dopsaj, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danica Čujić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr sc. Sanja Simić-Ogrizović, redovni profesor
Univerzitet u Banja Luci – Medicinski fakultet

Dr sc. Aleksandra Topić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ivana Novaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Svetlana Ignjatović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Mentoru, Prof. dr Violeti Dopsaj, neizmerno sam zahvalan na vođstvu i velikoj pomoći u svim fazama izrade ove disertacije. Hvala na razumevanju, ukazanom poverenju, podršci, mudrosti, znanju i prijateljskim savetima.

Dr Danici Ćujić zahvaljujem na pomoći i savetima u eksperimentalnom radu.

Dragoj Prof. dr Sanji Simić – Ogrizović, najtoplije hvala na razumevanju, ohrabrenju i ljudskosti pri svakom koraku izrade ove disertacije.

Veliko hvala Prof. dr Aleksandri Topić na podršci, pomoći i članstvu u Komisiji.

Prof. dr Ivani Novaković dugujem zahvalnost na znanju, savetima i podršci koji su učinili put izrade disertacije lepšim.

Moja iskrena zahvalnost je upućena Prof. dr Svetlani Ignjatović na svakoj sugestiji, savetu, podršci, razumevanju i ljudskosti koji su proces istraživanja učinili lakšim, a rad boljim.

Najtoplije se zahvaljujem docentkinji Nedi Milinković za korisne savete, podršku i prijateljstvo.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz Centra za medicinsku biohemiju, koji su mi na bilo koji način pomagali, kao i laboratorijskim tehničarima koji su učestvovali u eksperimentalnom delu rada. Hvala za strpljenje, osmehe i prijateljstvo.

Najiskrenije želim da zahvalim članovima moje porodice, a posebno supruzi Neveni na bezgraničnoj ljubavi, безусловnoj podršci i beskrajnom strpljenju.

Ovaj rad posvećujem svojim ćerkama Manji i Vidi.

Značaj određivanja hepcidina-25 i odabranih genetskih varijanti u lečenju anemije kod pacijenata u terminalnoj bubrežnoj slabosti

SAŽETAK

Novija istraživanja ukazuju da u okviru sistemske regulacije homeostaze gvožđa koja se ostvaruje složenim mehanizmima, značajnu ulogu ima hepcidin-25, peptid koji se sintetise u jetri, a izlučuje putem urina. Vezivanjem za feroportin, hepcidin-25 dovodi do sniženja koncentracije ovog transportera na membrani enterocita koji apsorbuju gvožđe iz hrane, makrofaga koji recikliraju gvožđe u slezini i jetri i hepatocita u kojima je gvožđe deponovano, a takođe indukuje i razgradnju feroportina u lizozomalnim vezikulama. Osim smanjenja funkcionalne aktivnosti, hepcidin-25 dovodi do mehaničkog blokiranja puta za izlazak gvožđa kroz feroportin. Pomenutim mehanizmima hepcidin-25 utiče na distribuciju gvožđa u telu, sa povećanom koncentracijom hepcidina dolazi do smanjenog ulaska gvožđa u cirkulaciju i povećane količine gvožđa u ćelijama koje eksportuju gvožđe, a na ovaj način gvožđe ostaje zarobljeno i nedostupno za eritropoezu. Deficit hepcidina-25 može biti rezultat mutacije u hemohromatoznom genu (*HFE*) koji kodira sintezu regulatornog proteina hepcidina-25 HFE. Najučestaliji polimorfizmi u genu *HFE* su C282Y i H63D. Gen *TMPRSS6* kodira membransku serin proteazu – matriptazu-2 koja suprimira transkripciju hepcidina-25 odvajanjem hemojuvelina. Anemija u terminalnoj bubrežnoj slabosti (ESRD) ubraja se u anemiju hronične bolesti, tj. anemiju u inflamaciji, a njena incidenca raste sa progresijom bubrežne slabosti i smanjenjem procenjene brzine glomerularne filtracije. Pored relativnog nedostatka eritropoetina i smanjenog životnog veka eritrocita, poremećaj u homeostazi gvožđa predstavlja osnovnu odliku anemije u ESRD. Ushodna regulacija sinteze hepcidina-25 je predložena kao objašnjenje poremećaja metabolizma gvožđa i neadekvatnog odgovora na terapiju anemije.

Cilj studije bio je da se odredi koncentracija hepcidina-25 kod bolesnika u ESRD, pacijenata sa sideropenijskom anemijom (IDA) i kontrolne grupe (KG), kao i da se utvrdi uticaj polimorfizma C282Y i H63D u genu *HFE* i A736V u genu *TMPRSS6* na koncentraciju hepcidina-25 i parametre statusa gvožđa. Za cilj smo imali ispitivanje korelacije koncentracije hepcidina-25 sa hematološkim parametrima, markerima statusa gvožđa i inflamacije, utvrđivanje odnosa sa terapijom koja se primenjuje u cilju korigovanja anemije kod bolesnika u ESRD, kao i ispitivanje dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije.

Studija je obuhvatila tri grupe ispitanika: 126 bolesnika u ESRD, 31 pacijentkinju sa IDA i KG sačinjenu od 30 ispitanika. Koncentracija hepcidina-25 je određena Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA testom.

Utvrđena je statistički značajno viša koncentracija hepcidina-25 kod bolesnika u ESRD grupi u odnosu na IDA [53,98 (18,82 – 110,51) $\mu\text{g/L}$ vs 3,00 (2,74 – 3,05) $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$] i KG [8,69 (3,89 – 15,22) $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$], i značajno viša u KG u odnosu na IDA grupu ($P < 0,001$). Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova varijanti A736V u genu *TMPRSS6* ($P = 0,852$), C282Y *HFE* ($P = 0,850$) i H63D *HFE* ($P = 0,266$), kao i *HFE* haplotipova ($P = 0,592$) između grupa ESRD, IDA i KG. Retka homozigotna varijanta G/G za *HFE* H63D i A/A za *HFE* C282Y nije detektovana u ispitivanim grupama. Bolesnici u ESRD lečeni hemodijalizom (ESRD-D) na terapiji agensima stimulacije eritropoeze (ESAs-th) imali su statistički značajno višu koncentraciju hepcidina-25 (59,34 $\mu\text{g/L}$ vs 16,36 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$) i koncentraciju feritina (421,4 $\mu\text{g/L}$ vs 90,0 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$) u odnosu na bolesnike bez terapije ESAs (ESAs-n). Nakon eliminacije uticaja koncentracije feritina, utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno razlikovala između ESAs-n i ESAs-th grupe ($P = 0,250$). U grupi ESRD-D utvrđena je statistički značajna povezanost hepcidina-25 sa feritinom i apsolutnim brojem retikulocita, koja je bila nezavisna od primene ESAs. Rezultati su pokazali da u celoj grupi bolesnika lečenih hemodijalizom 72,6% varijanse u koncentraciji hepcidina-25 može biti objašnjeno prediktorskim varijablama feritinom, apsolutnim brojem retikulocita, i koncentracijom hsCRP iznad 5 mg/L, u grupi bolesnika bez terapije ESAs 74,6% i u grupi lečenih ESAs 60,6%. Feritin i hsCRP iznad 5 mg/L su bili pozitivni, a apsolutni broj retikulocita negativni prediktori koncentracije hepcidina-25.

Utvrđena je statistički značajno viša koncentracija hepcidina-25 kod anemičnih bolesnika u ESRD (ESRD-A) sa pozitivnim balansom statusa gvožđa (PB) u poređenju sa ESRD-A sa adekvatnim statusom gvožđa (IS) (72,78 $\mu\text{g/L}$ vs 53,22 $\mu\text{g/L}$, $P = 0,041$) i ESRD-A sa apsolutnim nedostatkom gvožđa (ID) (12,25 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$). U grupi ID koncentracija hepcidina-25 je statistički značajno negativno korelirala sa %HYPO ($P = 0,034$), apsolutnim brojem retikulocita ($P = 0,048$) i IRF ($P = 0,010$). Rezultati dobijeni na grupi bolesnika sa PB pokazali su statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na CHr ($\beta = -0,493$, $P = 0,004$) i RSf ($\beta = -0,334$, $P = 0,036$).

Određena je optimalna granična vrednost za hepcidin-25 pri koncentraciji od $\geq 9,32$ $\mu\text{g/L}$ (osetljivost 90%, specifičnost 100%), feritin od $\geq 48,2$ $\mu\text{g/L}$ (osetljivost 87%, specifičnost

100%), TSAT od $\geq 16,8\%$ (osetljivost 91%, specifičnost 84%) i MCV od ≥ 81 fL (osetljivost 90%, specifičnost 100%) u razlikovanju ACD od IDA. Utvrđena je statistički značajna razlika u uticaju haplotipa *HFE* gena (H63D/C282Y) na koncentraciju hepcidina-25 ($P = 0,005$) i feritina ($P = 0,027$) kod muškaraca i žena u ESRD. Koncentracija transferina je bila pod uticajem udruženog efekta pola i polimorfizma A736V *TMPRSS6* u grupi ESRD ($P = 0,002$).

Ovom studijom je utvrđena statistički značajno viša koncentracija hepcidina-25 kod bolesnika u ESRD u odnosu na IDA i KG, i značajno viša u KG u odnosu na IDA. Rezultati naše studije nisu pokazali da postoji značajna razlika u zastupljenosti genotipova varijanti A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE*, kao i *HFE* haplotipova između ESRD, IDA i KG. Kod bolesnika u ESRD lečenih HD koncentracija hepcidina-25 je bila značajno povezana sa deponovanim gvoždem, inflamacijom i aktivnom eritropoezom nezavisno od primene ESAs, pri čemu su deponovano gvožđe i inflamacija bili pozitivni, a eritropoetska aktivnost negativni prediktori koncentracije hepcidina-25. Doza ESAs i *i.v.* gvožđa, kao i indeks rezistencije na ESAs (ERI) nije bio povezan sa hepcidinom-25. U grupi anemičnih bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa utvrđen je statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na funkcionalnu raspoloživost gvožđa za sintezu hemoglobina određenu novim hematološkim parametrima CHr (RSf). Koncentracija hepcidina-25 je značajno negativno korelirala sa nedostatkom gvožđa (%HYPO) i aktivnom eritropoezom (RET i IRF) kod bolesnika u ESRD sa apsolutnim deficitom gvožđa. Utvrđena je optimalna granična vrednost za hepcidin-25 $\geq 9,35$ $\mu\text{g/L}$ za razlikovanje ACD od IDA. Rezultati studije su pokazali da hepcidin-25 može biti koristan parametar u evaluaciji statusa gvožđa kod ESRD pacijenata i utvrđen je značajan kombinovan uticaj pola i polimorfizma *TMPRSS6* i *HFE* na anemiju u ESRD.

Ključne reči: Hepcidin-25, polimorfizam u genu *HFE* i *TMPRSS6*, anemija, inflamacija, terminalna bubrežna slabost, hemodijaliza, procenat hipohromnih eritrocita, sadržaj hemoglobina u retikulocitu, agensi stimulacije eritropoeze, intravenska terapija gvoždem

Naučna oblast: Medicinske nauke – Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

The Importance of Determining Hepcidin-25 and Selected Genetic Variants for Treating Anemia in Patients with End-Stage Renal Disease

ABSTRACT

The most recent research indicates that hepcidin-25, a peptide synthesized in the liver and excreted in the urine, might play a significant role in the systemic regulation of iron homeostasis that is achieved through complex mechanisms. By binding to ferroportin, hepcidin-25 provokes a decrease in the concentration of this transporter on the membrane of enterocytes absorbing iron from food, macrophages recycling iron in the spleen and liver, and hepatocytes in which the iron is stored, also causing ferroportin degradation in lysosomal vesicles. Besides diminishing functional activity, hepcidin-25 leads to the mechanical blocking of the pathway for iron exit via ferroportin. Through these mechanisms, hepcidin-25 affects iron distribution in the body – raised hepcidin concentrations result in a reduced influx of iron into the circulation and increased amounts of iron in iron-exporting cells, which causes iron to become trapped and inaccessible for erythropoiesis. Hepcidin-25 deficiency can be the consequence of a mutation in the hemochromatosis gene (*HFE*), which codes the synthesis of the hepcidin-25 regulatory protein HFE. The most frequent polymorphisms within the *HFE* gene are C282Y and H63D. The *TMPRSS6* gene codes the membrane-bound serine protease – matriptase-2 that decreases hepcidin-25 transcription by cleaving hemojuvelin. Anemia in end-stage renal disease (ESRD) is considered anemia of chronic disease, i.e., anemia of inflammation, and its incidence increases with the progression of renal failure and decline in estimated glomerular filtration rate. In addition to relative erythropoietin deficiency and reduced erythrocyte lifespan, the disturbance of iron homeostasis is a primary feature of anemia in ESRD. The up-regulation of hepcidin-25 synthesis has been suggested as a potential explanation for the disturbed iron metabolism and inadequate response to anemia therapy.

This study aimed to determine the concentration of bioactive hepcidin-25 in ESRD patients, subjects suffering from sideropenic anemia (IDA) and a control group (KG) and to establish the influence of polymorphisms C282Y and H63D in the *HFE* gene and A736V in the *TMPRSS6* gene on the hepcidin-25 level and iron status parameters. Our goal was to investigate the correlations of hepcidin-25 with hematological parameters, markers of iron status and inflammation, to determine its relationship with the treatment being applied to manage anemia in ESRD patients, and to explore the diagnostic properties of hepcidin-25 and iron status markers for discriminating anemia of chronic disease from sideropenic anemia.

The study included three groups of participants: 126 patients with ESRD, 31 patients with IDA and a KG comprised of 30 subjects. The concentration of hepcidin-25 was determined by a Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA assay.

Hepcidin-25 concentration was found to be statistically significantly higher in patients in the ESRD group compared to IDA [53.98 (18.82 – 110.51) $\mu\text{g/L}$ vs. 3.00 (2.74 – 3.05) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$] and KG [8.69 (3.89 – 15.22) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$], and significantly higher in KG compared to the IDA group ($P < 0.001$). No statistically significant differences were found in the frequency distribution of genotype variants A736V in the *TMPRSS6* gene ($P = 0.852$), *HFE* C282Y ($P = 0.850$) and *HFE* H63D ($P = 0.266$), or *HFE* haplotypes ($P = 0.592$) between ESRD, IDA and KG groups.

In all investigated groups, there were missing rare homozygote variants for the *HFE* H63D G/G and for the *HFE* C282Y A/A. ESRD patients on maintenance hemodialysis (ESRD-D) receiving erythropoiesis-stimulating agents therapy (ESAs-th) had significantly higher hepcidin-25 (59.34 $\mu\text{g/L}$ vs. 16.36 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) and ferritin levels (421.4 $\mu\text{g/L}$ vs. 90.0 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) in comparison to patients without ESAs therapy (ESAs-n). After eliminating the influence of ferritin concentration, we found that hepcidin-25 levels did not significantly differ between ESAs-n and ESAs-th groups ($P = 0.250$). In the ESRD-D group, a statistically significant association was observed between hepcidin-25 and ferritin and the absolute reticulocyte count, which was independent of ESAs administration. The results showed that 72.6% in the whole group of hemodialysis-treated patients, 74.6% in the ESAs-n and 60.6% of the hepcidin-25 variance in the ESAs-th group could be explained by the variations of the explanatory variables ferritin, absolute number of reticulocytes and hsCRP concentration above 5 mg/L. Ferritin and hsCRP above 5 mg/L were positive, and absolute reticulocyte count was a negative predictor of hepcidin-25 concentration.

Anemic ESRD patients (ESRD-A) with a positive iron balance (PB) had significantly higher hepcidin-25 concentration compared to the ESRD-A with an adequate iron status (IS) (72.78 $\mu\text{g/L}$ vs. 53.22 $\mu\text{g/L}$, $P = 0.041$) and ESRD-A with absolute iron deficiency (ID) (12.25 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$). In the ID group, the concentration of hepcidin-25 showed a statistically significant negative correlation with %HYPO ($P = 0.034$), absolute reticulocyte count ($P = 0.048$) and IRF ($P = 0.010$). The results obtained in the group of patients with PB showed a statistically significant negative effect of hepcidin-25 concentration on CHr ($\beta = - 0.493$, $P = 0.004$) and RSf ($\beta = - 0.334$, $P = 0.036$).

The cut-off values with the best diagnostic properties in distinguishing ACD from IDA was found for hepcidin-25 concentration of $\geq 9.32 \mu\text{g/L}$ (sensitivity 90%, specificity 100%), for ferritin $\geq 48.2 \mu\text{g/L}$ (sensitivity 87%, specificity 100%), TSAT $\geq 16.8\%$ (sensitivity 91%, specificity 84%) and MCV $\geq 81 \text{ fL}$ (sensitivity 90%, specificity 100%). There was a statistically significant interaction between gender and haplotypes of the *HFE* gene (H63D/C282Y) on hepcidin-25 ($P = 0.005$) and ferritin ($P = 0.027$) concentrations in ESRD patients. Transferrin concentration was influenced by the joint effect of gender and the *TMPRSS6* A736V polymorphism in the ESRD group ($P = 0.002$).

This study revealed that hepcidin-25 concentration was statistically significantly higher in ESRD patients than IDA and KG and significantly higher in the KG than IDA. The results of our study failed to document any significant difference in the frequency distribution of gene variants of *TMPRSS6* A736V, *HFE* C282Y, *HFE* H63D, and *HFE* haplotypes between ESRD, IDA and KG. In ESRD patients on maintenance HD, the hepcidin-25 levels are independently and positively associated with iron stores and inflammation, and inversely with active erythropoiesis, regardless of ESAs administration. Maintenance ESAs and *i.v.* iron dose, as well the ESAs resistance index (ERI) were not related to hepcidin-25 levels. In the group of anemic ESRD patients with a positive iron balance, we found a statistically significant negative influence of hepcidin-25 concentration on the most recent iron availability for hemoglobin synthesis reflected by CHr and RSf levels. In ESRD patients with absolute iron deficiency, hepcidin-25 concentration showed a significant negative correlation with iron deficiency (as reflected by %HYPO levels) and active erythropoiesis (as reflected by RET and IRF). The optimal cut-off value of $\geq 9.35 \mu\text{g/L}$ was determined for hepcidin-25 to distinguish ACD from IDA. The study results indicated that hepcidin-25 could be a valuable parameter for evaluating iron status in ESRD patients and highlight the important gender-related involvement of the *TMPRSS6* and *HFE* polymorphism on anemia in ESRD patients.

Keywords: Hepcidin-25, *HFE* and *TMPRSS6* gene polymorphism, anemia, inflammation, end-stage renal disease, hemodialysis, percentage of hypochromic erythrocytes, reticulocyte hemoglobin content, erythropoiesis-stimulating agents, intravenous iron therapy

Scientific field: Medical sciences – Pharmacy

Scientific subfield: Medical Biochemistry

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

Skraćenica	Srpski	Engleski
ACVR2A	Aktivin receptor tip 2A	<i>Activin receptor type-2A</i>
ALK	Kinaza nalik aktivinu	<i>Activin-like kinase</i>
ARNT	Nuklearni translokator aril ugljovodoničnog receptora	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
BMI	Indeks telesne mase	<i>Body mass index</i>
BMP	Morfogenetski protein kostiju	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BRE	BMP responsivni element	<i>BMP responsive element</i>
Chr	Sadržaj hemoglobina u retikulocitu	<i>Reticulocyte cellular hemoglobin content</i>
CLSI EP	Protokol evaluacije Instituta za kliničke i laboratorijske standarde	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute Evaluation Protocol</i>
dbSNP	Arhiva polimorfizama pojedinačnih nukleotidnih sekvenci	<i>Data base of Single Nucleotide Polymorphism</i>
Dcytb	Duodenalni citohrom b	<i>Duodenal cytochrome b</i>
DDD	Preporučena dnevna doza	<i>Daily Desirable Dose</i>
DF	Faktor razblaženja	<i>Dilution Factor</i>
DMT1	Transporter dvovalentnih metala 1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
eGFR	Procenjena brzina glomerularne filtracije	<i>estimated Glomerular Filtration Rate</i>
ELISA	Enzimski imunosorbent test	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERFE	Eritroferon	<i>Erythroferrone</i>
ERI	Indeks rezistencije na ESAs	<i>ESA Resistance Index</i>
ESAs	Agensi stimulacije eritropoeze	<i>Erythropoiesis Stimulating Agents</i>
ESRD	Terminalni stadijum hronične bubrežne slabosti	<i>End Stage Renal Disease</i>
ESRD-D	Bolesnici lečeni hroničnim programom hemodijalize	<i>ESRD patients on hemodialysis</i>
ESRD-PD	Bolesnici u predijaliznom stadijumu	<i>ESRD-Predialysis patients</i>
Fpn-GFP	Ferroportin obeležen fluorescentnim proteinom zelene boje	<i>Ferroportin-Green Fluorescent Protein</i>
<i>FTH-1</i>	Gen koji kodira sintezu teškog lanca feritina 1	<i>Ferritin heavy chain 1 gene</i>
GWAS	Studije asocijacije na celokupnom genomu	<i>Genome Wide Association Studies</i>
<i>HAMP</i>	Gen koji kodira sintezu antimikrobnog peptida hepcidina	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide gene</i>
HBS	Hronična bubrežna slabost	<i>Chronic kidney disease</i>
HD	Hemodijaliza	<i>Hemodialysis</i>
HDAC3	Histon deacetilaza 3	<i>Histone Deacetylase 3</i>
HFE	Hemohromatozni protein	<i>Hereditary Hemochromatosis protein</i>
HH	Hereditarna Hemohromatoza	<i>Hereditary Hemochromatosis</i>
HIF	Hipoksijom indukovani faktor	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HJV	Hemojuvelin	<i>Hemojuvelin</i>

HRE	Hipoksija promoterni element	<i>Hypoxia responsible element</i>
hsCRP	Visoko-osetljivi C-reaktivni protein	<i>High-sensitivity C-reactive protein</i>
%HYPO	Procenat hipohromnih eritrocita	<i>% of the Hypochromic erythrocytes</i>
HYPO-He	Ekvivalent udela hipohromnih eritrocita	<i>HYPO Equivalent</i>
IDA	Sideropenijska anemija	<i>Iron Deficiency Anemia</i>
IFCC	Internacionalna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu	<i>International Federation for Clinical Chemistry and laboratory medicine</i>
IL-6	Interleukin-6	<i>Interleukin-6</i>
IRIDA	Anemija usled nedostatka gvožđa-neosetljiva na terapiju gvožđem	<i>Iron-Refractory Iron-Deficiency Anemia</i>
IRP	Regulatorni protein gvožđa	<i>Iron Regulatory Protein</i>
IRE	Responsivni element gvožđa	<i>Iron Responsive Element</i>
IRF	Frakcija nezrelih retikulocita	<i>Immature Reticulocyte Fraction</i>
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina	<i>Messenger RNA</i>
<i>i.v.</i>	Intravenska	<i>Intravenous</i>
JAK-STAT3	Janus kinaza-signalni put i aktivator transkripcije 3	<i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
KG	Kontrolna grupa	<i>Control group</i>
LEAP-1	Antimikrobni peptid-1 eksprimiran u jetri	<i>Liver-Expressed Antimicrobial Peptide-1</i>
LoB	Granica slepe probe	<i>Limit of blank</i>
LoQ	Granica kvantifikacije	<i>Limit of quantitation</i>
LPS	Lipopolisaharid	<i>Lipopolysaccharide</i>
LSECs	Sinusoidne endotelne ćelije jetre	<i>Liver Sinusoidal Endothelial Cells</i>
MCHC	Prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima	<i>Mean cellular hemoglobin concentration</i>
MGB	Minor Groove Binder stabilizator DNK	<i>Minor Groove Binder</i>
MRV	Prosečna zapremina retikulocita	<i>Mean Reticulocyte Volume</i>
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFQ	Apsorber fluorescentne boje	<i>Nonfluorescent quencher</i>
NIST	Nacionalni institut za standarde i tehnologiju	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
NKF	Nacionalna fondacija za bubrege	<i>National Kidney Foundation</i>
NRF2	Nuklearni faktor eritroidni-2 povezan faktor 2	<i>Nuclear factor erythroid-2 Related Factor 2</i>
NTBI	Slobodno gvožđe u cirkulaciji	<i>Non Transferin Bound Iron</i>
PDGF-BB	Trombocitni faktor rasta BB	<i>Platelet-Derived Growth Factor-BB</i>
PHD	Protil hidrosilaza	<i>Prolyl hydroxylase</i>
Ret-HE	Ekvivalent sadržaja hemoglobina u retikulocitu	<i>Reticulocyte Hemoglobin Equivalent</i>
RG	Homolozi familije molekula odbojnog navođenja	<i>Repulsive Guidance molecule family homologs</i>
RLU	Relativne svetlosne jedinice	<i>Relative light units</i>

rtPCR	Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu	<i>real-time Polymerase Chain Reaction</i>
SAD	Sjedinjene Američke Države	<i>United States of America</i>
<i>SLC40A1</i>	Gen koji kodira sintezu feroportina	<i>SoLute Carrier family 40 member 1</i>
SMAD	SMAD transkripcioni faktori	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
SRM	Standardni referentni materijal	<i>Standard Reference Material</i>
sTfR	Solubilni transferinski receptori	<i>Soluble Transferrin Receptors</i>
TfR	Transferinski receptor	<i>Transferrin receptor</i>
TGF15	Faktor rasta i diferencijacije 15	<i>Transforming Growth Factor 15</i>
TIBC	Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa	<i>Total iron binding capacity</i>
TLR4	Toll-like receptor 4	<i>Toll-like receptor 4</i>
<i>TMPRSS6</i>	Transmembranska serin proteaza 6	<i>Transmembrane Serine Protease 6</i>
TSAT	Saturacija transferina	<i>Transferrin saturation</i>
WHO	Svetska zdravstvena organizacija	<i>World Health Organization</i>

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Istorijat.....	1
1.2.	Uloge gvožđa.....	1
1.3.	Odeljci, apsorpcija, reciklizacija i transport gvožđa.....	2
1.4.	Sistemska regulacija homeostaze gvožđa.....	6
1.4.1.	Sinteza i struktura hepcidina-25.....	7
1.4.2.	Molekularne osnove sistemske homeostaze gvožđa.....	9
1.4.2.1.	Mehanizam dejstva hepcidina-25.....	9
1.4.2.2.	Sprega hepcidin-feroportin: Strukturni i funkcionalni aspekti Hpcidin-25 – Feroportin interakcije.....	11
1.5.	Regulacija sinteze hepcidina.....	15
1.5.1.	Regulacija hepcidina gvožđem: saznanja dobijena iz HH i IRIDA.....	18
1.5.2.	Regulacija hepcidina HJV i BMP-SMAD putem.....	21
1.5.3.	Regulacija hepcidina pomoću HFE i TFR2.....	23
1.5.4.	Regulacija hepcidina posredstvom matriptaze-2.....	24
1.5.5.	Gvožđe u jetri i hepcidin.....	24
1.5.6.	Regulacija ekspresije hepcidina inflamacijom, eritropoetskom aktivnošću i drugim stimulusima.....	25
1.5.7.	Komunikacija između sistemske i ćelijske homeostaze gvožđa.....	27
1.6.	Kinetika hepcidina.....	29
1.7.	Hronična bubrežna slabost.....	30
1.7.1.	Definicija i klasifikacija HBS.....	31
1.7.2.	Faktori rizika za nastanak HBS.....	32
1.8.	Anemija u HBS: karakteristike, patofiziologija i evaluacija.....	33
1.9.	Terapija anemije u HBS.....	42
2.	Ciljevi istraživanja.....	45
3.	Materijali i metode.....	46
3.1.	Izbor ispitanika.....	46
3.1.1.	Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja.....	47
3.2.	Terapija hemodijalizom.....	51
3.3.	Terapija anemije kod bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti.....	51
3.4.	Uzorkovanje.....	53
3.5.	Laboratorijske analize.....	53
3.5.1.	Određivanje koncentracije hepcidina-25.....	54
3.5.2.	Analitičke karakteristike testa za određivanje koncentracije hepcidina-25.....	59
3.5.3.	Izolacija DNK i detekcija pojedinačnih polimorfizama <i>TMPRSS6</i> i <i>HFE</i> gena ...	63

3.5.4.	Određivanje hematoloških parametara	66
3.5.5.	Određivanje biohemijskih parametara	66
3.6.	Statistička obrada podataka	71
4.	Rezultati	73
4.1.	Opšti podaci o ispitanicima	73
4.2.	Biohemijski i hematološki parametri	75
4.3.	Analitička validacija testa za određivanje koncentracije hepcidina-25	80
4.4.	Koncentracija hepcidina-25	83
4.5.	Zastupljenost varijanti u genu <i>TMPRSS6</i> i <i>HFE</i>	87
4.6.	Hematološki parametri, parametri statusa gvožđa i inflamacije u grupi ESRD-D i ESRD-PD	89
4.7.	Analiza anemije u grupi ESRD bolesnika	92
4.8.	Analiza anemije hronične bolesti primenom Thomasovog algoritma	95
4.9.	Analiza uticaja terapije anemije sa ESAs i <i>i.v.</i> gvoždem	99
4.10.	Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa retikulocitima	108
4.11.	Varijante u genu <i>TMPRSS6</i> i <i>HFE</i>, koncentracija hepcidina-25 i status gvožđa	115
4.12.	Ispitivanje dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije	117
5.	Diskusija	120
5.1.	Opšti podaci o ispitanicima	121
5.2.	Koncentracija hepcidina-25 u serumu bolesnika u ESRD, osoba sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe	122
5.3.	Analiza zastupljenosti polimorfizma gena: <i>TMPRSS6</i> (A736V) i <i>HFE</i> (C282Y i H63D)	124
5.4.	Analiza hematoloških parametara i indeksa, markera statusa gvožđa i inflamacije kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe	126
5.5.	Analiza koncentracije hepcidina-25, hematoloških parametara i indeksa, markera statusa gvožđa i inflamacije kod ESRD-D i ESRD-PD bolesnika	128
5.6.	Analiza prisustva anemije u grupi ESRD bolesnika	130
5.7.	Analiza anemije hronične bolesti sa i bez deficita gvožđa kod bolesnika u ESRD ..	131
5.8.	Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa terapijom <i>i.v.</i> gvožđa i/ili ESAs	132
5.9.	Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa apsolutnim brojem retikulocita, eritrocitnim i retikulocitnim indeksima kod bolesnika u ESRD	140
5.10.	Analiza zastupljenosti varijanti A736V u genu <i>TMPRSS6</i>, C282Y i H63D u genu <i>HFE</i> i haplotipa C282Y i H63D <i>HFE</i> u odnosu na pol i razlika u koncentraciji hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u odnosu na A736V <i>TMPRSS6</i>, C282Y i H63D <i>HFE</i> kod bolesnika u ESRD	146
5.11.	Dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 i markera statusa gvožđa za razlikovanje anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije	147

6.	Zaključak	149
7.	Literatura	153
8.	Biografija	173
9.	Izjave	174

1. Uvod

1.1. Istorijat

Istraživanja na polju metabolizma gvožđa doživljavaju procvat krajem 20. i početkom 21. veka (1). Otkrića koja su postignuta u ovom periodu počivaju na radovima profesora Clement Alfred Finch-a (1915 – 2010.). Studije pod vođstvom pomenutog profesora su ukazale na postojanje nekoliko regulatora koji moduliraju snabdevanje gvožđem radi održavanja stabilnih zaliha, obezbeđuju adekvatnu količinu gvožđa za eritropoezu i ograničavaju dostupnost gvožđa patogenim mikroorganizmima (2). Ovaj američki hematolog predvideo je postojanje medijatora kao što su hepcidin, ferroportin i eritroferon (2, 3). Grupa naučnika na čelu sa naslednikom profesora Finch-a, Tomasom Ganzom, tokom potrage za peptidom urođene imunosti β -defenzinom-1, u humanom urinu otkriva defenzinu sličan peptid sačinjen od 25 aminokiselina i 4 disulfidne veze (4). U januaru 1998. godine ista grupa autora dešifruje sekvencu ovog peptida koga zbog upečatljive ekspresije informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) u jetri (hep-) i slabe *in vitro* antimikrobne aktivnosti (-cidin) naziva hepcidin (5, 6). Istovremeno, Alexander Krause i sar. izoluju peptid iste strukture u ultrafiltratu plazme i daju mu ime LEAP-1 (*eng. liver-expressed antimicrobial peptide*) (7). Radovi Pigeon i sar. (8) i Nicolas i sar. (9) 2001. godine po prvi put dovode hepcidin u vezu sa metabolizmom gvožđa i predlažu ga kao vodećeg kandidata za dugo traženi hormon regulacije metabolizma gvožđa.

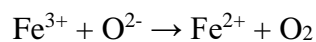
1.2. Uloge gvožđa

Gvožđe je mikroelement neophodan skoro svim živim organizmima. Iako je jedan od najprisutnijih elemenata u životnoj sredini, oksidovani oblik gvožđa (Fe^{3+}) ima malu bioraspoloživost i teško je dostupan većini oblika života. Shodno tome, ljudski organizam je razvio mehanizme za čuvanje i unutrašnje recikliranje gvožđa (10-13). Sposobnost gvožđa da donira ili prihvati elektron u ćelijskom i vanćelijskom okruženju je ono što ga čini svestranom katalitičkom komponentom mnogih enzima uključenih u bioreakcije kritičnih biosintetskih puteva, kao i enzima zaduženih za stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika koji učestvuju u odbrani od mikroorganizama. Gvožđe takođe predstavlja esencijalnu funkcionalnu komponentu brojnih fundamentalnih ćelijskih i sistemskih procesa uključujući transport kiseonika, ćelijsko disanje i ćelijsku signalizaciju (10-13). Iako i drugi metali, uključujući bakar i mangan, poseduju sličnu sposobnost za transfer elektrona, zastupljenost gvožđa u prirodi i relativno

širok redukcionni potencijal od - 500 do + 1000 mV (mera afiniteta da donira ili prihvati elektron) čine da gvožđe predstavlja centralni element navedenih dinamičkih procesa (14).

Ove bitne funkcije gvožđe najčešće obavlja koordinirano bočnim lancima proteina, kompleksirano unutar porfirinskog prstena hema ili unutar klastera sa sumporom (10, 13, 15). Izvan ovih kontrolisanih okruženja višak slobodnog gvožđa može biti veoma toksičan. Zbog svoje redukujuće aktivnosti, gvožđe može katalizovati stvaranje reaktivnih formi kiseonika koje mogu oštetiti DNK, proteine i lipide (11, 14, 15).

Gvožđe je najprisutniji metal sa promenljivom valencom u ljudskom organizmu. Pod uticajem gvožđa u značajnoj meri može doći do povećanja oksidativnog stresa nezavisno od prisustva antioksidantnih enzima (16). U reakciji koja je katalizovana jonima gvožđa nastaje jedan od najreaktivnijih slobodnih radikala, hidroksil radikal. Reakcija nastajanja hidroksil radikala se odvija u dva stupnja, pri čemu u prvoj reakciji Fe^{3+} reaguje sa superoksidnim anjonom, a nakon toga u drugoj sa vodonik peroksidom. Navedene reakcije su poznate kao Fentonova reakcija i primarno se odvijaju u mitohondrijama, peroksizomima i mikrozmomima. Uslov za odvijanje reakcije je da gvožđe mora biti oslobođeno od transportnog proteina - transferina (*eng. non transferin bound iron*, NTBI) i svojih depoa (ferritina) (14, 17).



Fentonova reakcija

Zbog navedenih razloga ljudski organizam je razvio specijalizovane proteine i homeostatske mehanizme kako bi striktno regulisao unutarćelijske i vanćelijske koncentracije gvožđa i na taj način sa jedne strane sprečio nedovoljno snabdevanje gvožđem koje je neophodno za kritične funkcije, i sa druge strane ograničio nekontrolisan višak gvožđa koje može oštetiti ćelije i tkiva.

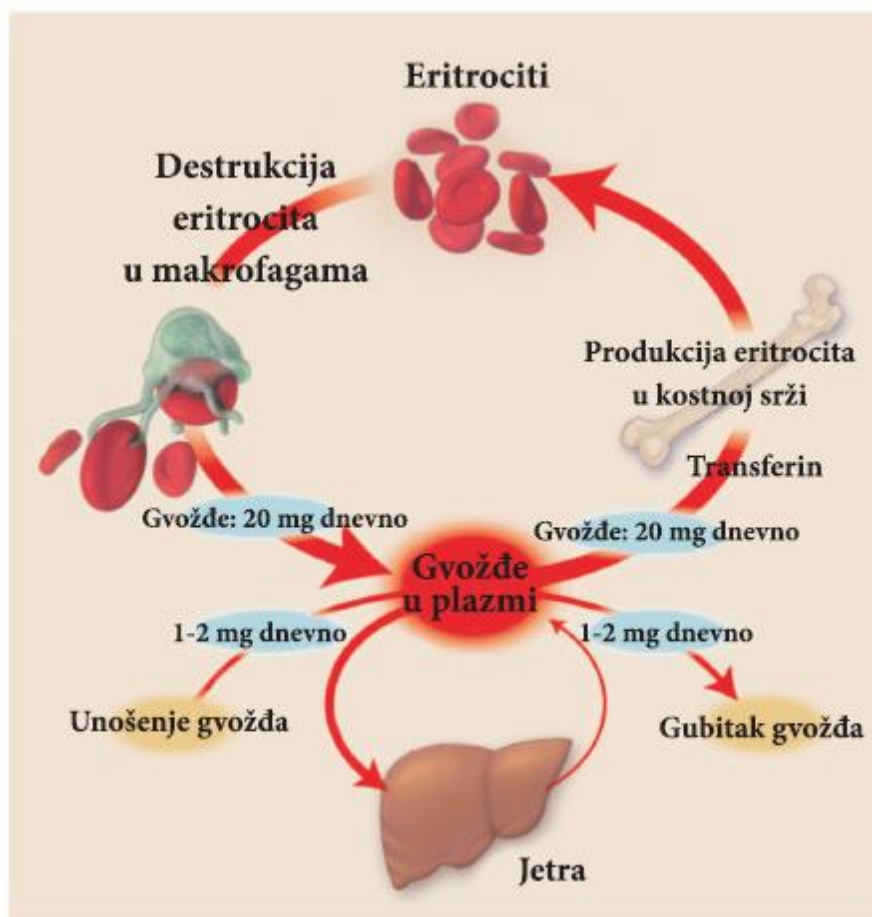
1.3. Odeljci, apsorpcija, reciklizacija i transport gvožđa

Ukupni telesni sadržaj gvožđa kod odraslih ljudi iznosi približno 3 – 4 g, dok su normalni dnevni gubici putem znoja, urina, ekfolijacijom enterocita, putem krvi i dr. samo 1 – 2 mg. Da bi ostale u ravnoteži gvožđa, zdrave osobe moraju da apsorbuju sličnu količinu gvožđa iz hrane (Slika 1) (10, 11, 13). Gvožđe je u organizmu raspoređeno u tri odeljka kao

funkcionalno, transportno i deponovano gvožđe (10, 11, 13). Najveći deo telesnog gvožđa, približno 2 – 3 g, čine funkcionalne komponente u obliku hemoglobina, mioglobina i enzima. Kod ljudi se dnevno koristi približno 20 mg gvožđa za stvaranje $\sim 2 \times 10^{11}$ novih eritrocita, što čini 80% dnevnih potreba za gvožđem. Najveći deo gvožđa za sintezu novih eritrocita se dobija razgradnjom ostarelih eritrocita pomoću tkivnih makrofaga. Na ovaj način gvožđe neprekidno kruži u organizmu, odnosno koristi se kontinuirano i recikularno (Slika 1) (10, 13, 18).

Količina gvožđa koja nije odmah neophodna se skladišti u hepatocitima i retikuloendotelnom sistemu jetre, slezine i koštane srži u formi feritina i hemosiderina. Pomenutim procesom organizam sprečava toksično dejstvo slobodnog gvožđa. Deponovano gvožđe je drugi po veličini odeljak gvožđa i predstavlja 15 – 20% ukupne količine telesnog gvožđa. U fiziološkim uslovima količine gvožđa u skladištima mogu biti veoma promenljive i potrošene kod mnogih žena u reproduktivnom dobu zbog menstrualnog gubitka krvi u kombinaciji sa malim unosom gvožđa putem hrane. Reciklirajuće makrofage u slezini, jetri i koštanoj srži funkcionišu kao odeljak zadužen za brzu nadoknadu (19). Slezina, koja predstavlja značajan odeljak za skladištenje makrofaga, obično sadrži samo oko 0,05 g gvožđa, ali ima kapacitet za mnogo veće količine (20). Samo oko 0,3 g gvožđa sadržano je u mioglobinu mišića i enzimima (10, 21).

Gvožđe se u krvotok doprema retikuloendotelnim makrofagama koje “spašavaju” gvožđe iz starih eritrocita (20 – 25 mg dnevno) i duodenalnih enterocita koji apsorbuju gvožđe iz hrane (1 – 2 mg dnevno), a ostatak obezbeđuju telesne zalihe (Slika 1) (10, 13, 18). Gvožđe iz hrane se transportuje preko apikalne membrane enterocita pomoću dvovalentnog metalnog transportera 1 (DMT1) nakon redukcije feri-reduktazama kao što je duodenalni citohrom b (Dcytb) (Slika 2) (10, 11, 22). Postoje alternativni mehanizmi za preuzimanje gvožđa koji je sastavni deo hema, ali specifični transporteri i dalje nisu poznati. Retikuloendotelne makrofage fagocituju stare eritrocite radi razgradnje u fagolizozomima, a oslobađanje gvožđa je praćeno delovanjem hem-oksigenaze 1 (11). I u enterocitima i u makrofagama importovano gvožđe se može koristiti za ćelijske metaboličke procese, deponovati ili transportovati u plazmu za potrebe drugih tkiva (10, 11, 21).

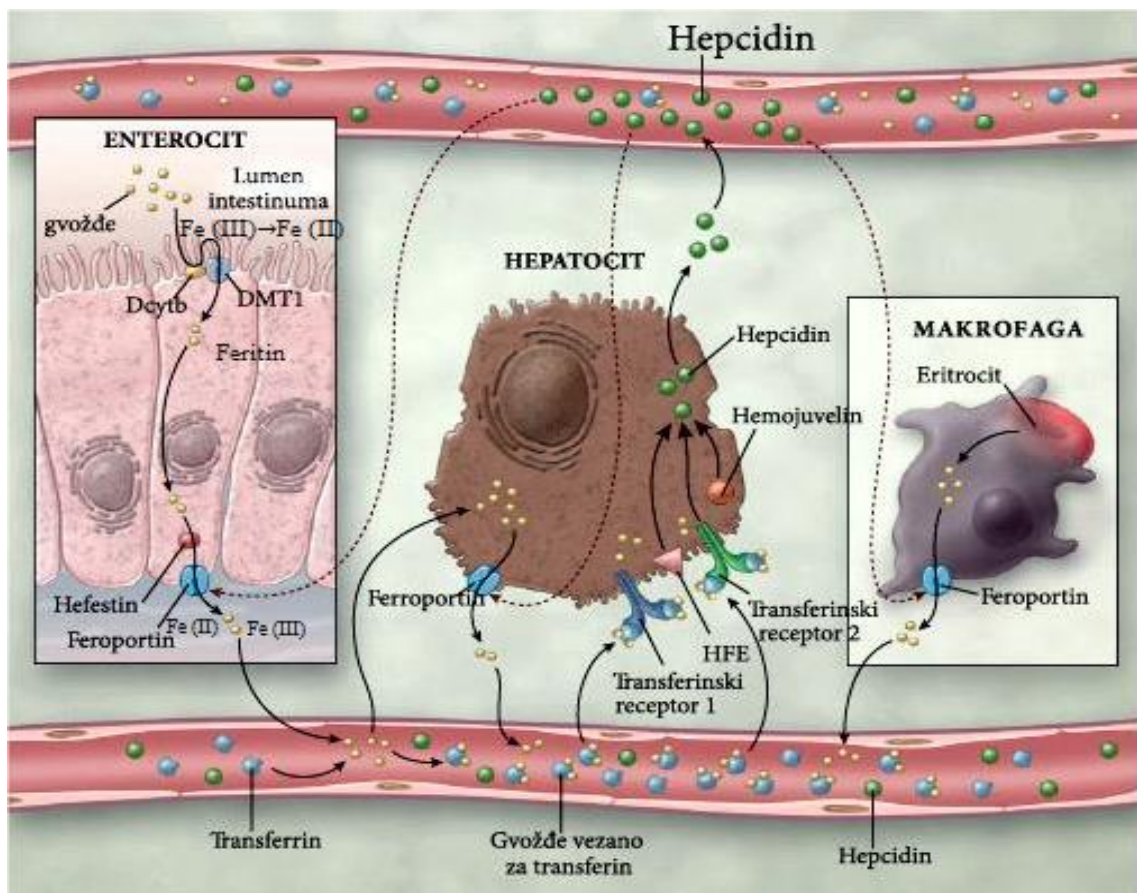


Slika 1. Distribucija i reciklizacija gvožđa u organizmu. Preuzeto i prilagođeno od (10)

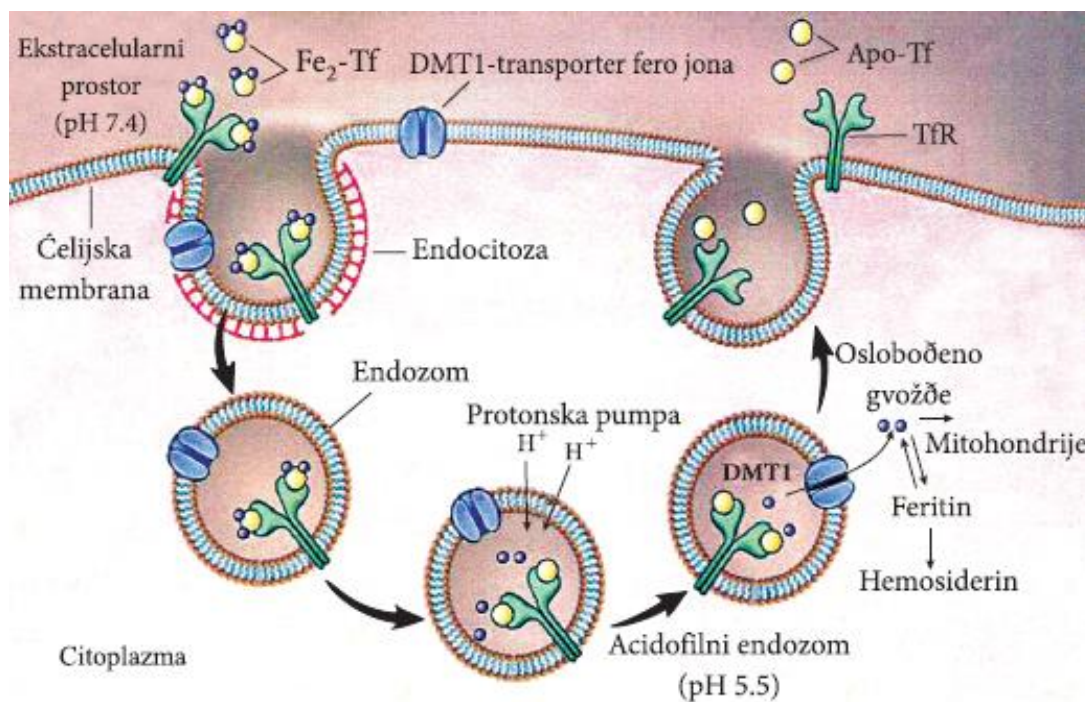
Regulacija procesa apsorpcije predstavlja primarni mehanizam kontrole količine gvožđa u organizmu, po čemu se gvožđe razlikuje od drugih mikroelemenata čija količina zavisi od izlučivanja (10). Mehanizam transporta gvožđa kroz bazolateralnu membranu duodenalnih enterocita je ključan u regulaciji količine apsorbovanog gvožđa. Transporter feroportin sudeluje u efluksu divalentnog gvožđa kroz bazolateralnu membranu apsorptivnih enterocita, a osim u ćelijama duodenuma nalazi se i na hepatocitima, ćelijama retikuloendotelne sistema jetre, placente, slezine, što upućuje na zajednički mehanizam eksporta apsorbovanog, recikliranog i deponovanog gvožđa (10, 11, 21, 23). Sintaza feroportina je transkripciono regulisana ćelijskom hipoksijom, koncentracijom gvožđa i hema, i inflamatornim signalima (24). Transport elementarnog gvožđa iz ćelije u cirkulaciju praćen je oksidacijom fero-oksidadom hefestinom i ceruloplazminom da bi se omogućilo vezivanje gvožđa na transporter transferin (Slika 2) (10, 25, 26).

Gvožđe se transportuje telom pomoću proteina plazme transferina, čija su dva mesta za vezivanje gvožđa u fiziološkim uslovima okupirana 20 – 45%. Transferin predstavlja vezu

između deponovanog i funkcionalnog odeljka gvožđa, tj. njegova osnovna funkcija se ogleda u prenosu gvožđa od makrofaga, parenhimskih ćelija jetre i koštane srži do ćelija na kojima su ekspimirani transferinski receptori i kojima je gvožđe neophodno za sintezu određenih jedinjenja (10). Ćelije perifernih tkiva uglavnom preuzimaju gvožđe mehanizmom koji uključuje stvaranje kompleksa transferin-transferinski receptor. Ovaj kompleks biva podvrgnut endocitozi u kiseloj sredini endozoma gde gvožđe disocira iz kompleksa i transportuje se preko endozomske membrane u citoplazmu (Slika 3). Navedeni put preuzimanja gvožđa je označen kao „klasični put visokog afiniteta i niskog kapaciteta“ (10). Ćelije stiču transferinski receptor na svojoj površini u određenom stupnju razvoja, pri čemu je najveća ekspresija detektovana na ćelijama sa povećanim potrebama za gvožđem. Oko 80% ukupne količine transferinskih receptora sadrže prekursori eritrocita, a pored njih dosta transferinskih receptora poseduju ćelije placente i ćelije koje se brzo dele. Količina transportnog gvožđa iznosi samo 2 – 4 mg. Imajući u vidu da transferin isporučuje gvožđe ciljanim ćelijama u količini od 20 – 25 mg/dan, pul gvožđa u cirkulaciji se mora obnavljati svakih nekoliko sati da bi se zadovoljile dnevne potrebe (10, 11).



Slika 2. Mehanizam apsorpcije, transporta i reciklizacije gvožđa. Preuzeto i prilagođeno od (10)



Slika 3. Preuzimanje gvožđa posredstvom kompleksa transferin – transferinski receptor. Preuzeto i prilagođeno od (10)

Uprkos promenama u sadržaju gvožđa u ishrani i potrebama tkiva za gvožđem, koncentracija gvožđa u krvnoj plazmi, kao i ukupni sadržaj gvožđa u organizmu, su izuzetno stabilni kod zdravih ljudi. Štaviše, apsorpcija gvožđa u dvanaestopalačnom crevu se povećava nekoliko puta nakon gubitka krvi ili izloženosti hipoksiji, ili kao odgovor na nedostatak gvožđa. Ova zapažanja pružila su rane dokaze da apsorpcija i distribucija gvožđa u tkivima moraju biti podložni endokrinom regulaciji (27).

1.4. Sistemska regulacija homeostaze gvožđa

Smatra se da je sistemska regulacija homeostaze gvožđa, tj. stabilnost koncentracije gvožđa u serumu, vanćelijskoj tečnosti i ukupni sadržaj gvožđa u organizmu striktno regulisani interakcijom glavnog regulatora homeostaze gvožđa, hepatičnog hormona hepcidina, i njegovog receptora i osnovnog ćelijskog eksportera za gvožđe ferroportina. Ferroportin predstavlja osnovni put kojim gvožđe može, u značajnoj količini, da izađe iz duodenalnih enterocita koji apsorbuju gvožđe iz hrane, iz makrofaga koji recikliraju gvožđe u slezini i jetri i iz hepatocita u kojima je gvožđe deponovano (10, 21, 28). Pokazano je da je bioaktivna forma hepcidina peptid od 25 aminokiselina (hepcidin-25) koji se sintetiše u jetri, raspodeljuje u

plazmi, a u urinu se izlučuju produkti njegove razgradnje od 20 i 22 aminokiseline (10, 21, 23, 29).

Poremećaj homeostaze gvožđa može se manifestovati kao telesni deficit gvožđa ili višak (opterećenje gvožđem), kao i poremećena distribucija gvožđa u tkivima, u kojima pojedina tkiva ili organi mogu postati deficitarni ili preopterećeni gvožđem. Takvi poremećaji gvožđa mogu biti uzrokovani genetskim lezijama koje direktno narušavaju regulaciju homeostaze gvožđa, ili uslovima koji indirektno utiču na regulaciju metabolizma gvožđa (21).

Iako sve ćelije u višćelijskim organizmima sadrže gvožđe, na sistemsku homeostazu gvožđa prvenstveno utiču: funkcionalno gvožđe u eritrocitima i njihovim prekurzorima, deponovano gvožđe u hepatocitima jetre i makrofagama slezine i jetre, transportno gvožđe u krvnoj plazmi i enterociti u dvanaestopalačnom crevu (Slika 2) (10, 21).

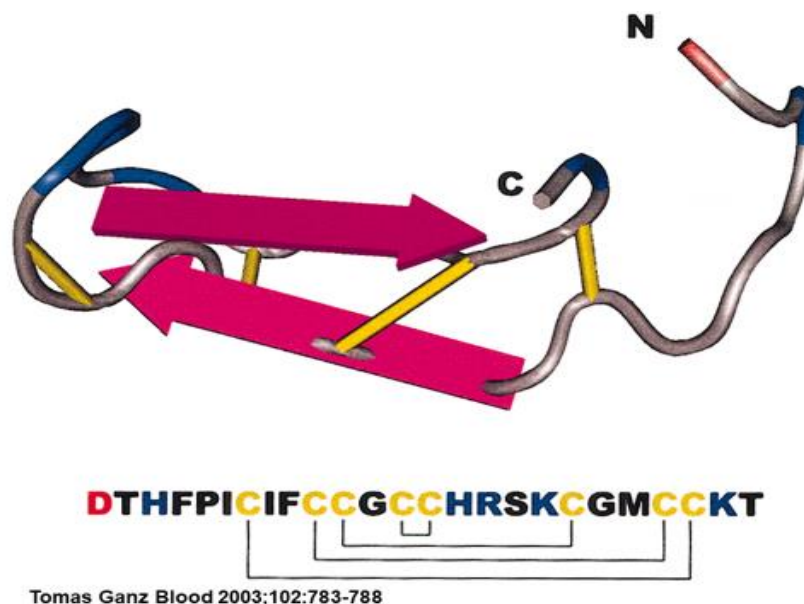
1.4.1. Sinteza i struktura hepcidina-25

Sinteza hepcidina je kodirana *HAMP* genom (*eng. hepcidin antimicrobial peptide gene*; OMIM 606464), koji je sačinjen od dva introna i tri egzona, a lokalizovan je na hromozomu 19q13.1 (5). Smatra se da hepatociti predstavljaju primarno mesto sinteze hepcidina zbog blizine portalnog venskog sistema koji im dostavlja najveću količinu gvožđa apsorbovanu iz proksimalnog duodenuma, zatim zbog blizine kupferovih ćelija u kojima se recikliraju ostareli eritrociti, kao i zbog činjenice da predstavljaju depo gvožđa (6, 29, 30). Pored jetre, manje količine hepcidina mogu biti sintetisane od strane različitih tipova ćelija npr. kardiomiocita (7, 31), tubulskih ćelija bubrega (32), makrofaga (33) i adipocita (34).

HAMP gen kodira sintezu prekursora pre-prohepcidina sačinjenog od 84 aminokiseline. Enzimskim odvajanjem signalnog peptida u prvoj post-translacionoj modifikaciji pre-prohepcidin se transformiše u peptid od 64 aminokiseline nazvan prohepcidin. Zatim, tokom druge post-translacione modifikacije, dolazi do uklanjanja 39 aminokiselina pro-regiona peptida dejstvom konvertaze slične furinu, pri čemu nastaje hepcidin-25, bioaktivna forma hepcidina od 25 aminokiselina i molekulske mase od 2,789 kDa. Osim bioaktivne forme hepcidina, tri manje izoforme od 24, 22 i 20 aminokiselina postoje, ali su prisutne samo u serumu bolesnika sa oboljenjima koja su povezana sa povećanom koncentracijom hepcidina-25 kao što su sepsa ili terminalna bubrežna slabost (6, 10, 35-37). Koncentracija hepcidina-25 kod zdravih ljudi kreće se u rasponu od približno 5,58-55,78 µg/L (38-40), što je oko sto puta viša koncentracija od koncentracije peptidnih hormona slične veličine kao što su insulin,

glukagon ili paratiroidni hormon. Zbog male veličine *HAMP* gena, male zastupljenosti njegovih nasumičnih mutacija i nedostatka motiva sekvenci koje su zajedničke sa poznatim genima povezanim sa metabolizmom gvožđa, hepcidin nije pronađen genetskim metodama. Višestruki slučajni događaji pomogli su u identifikaciji hepcidina i njegove funkcije u homeostazi gvožđa (6).

Grupa naučnika okupljena oko Tomasa Ganz je primenom nuklearne magnetne rezonance odredila strukturu hepcidina-25. Rezultati njihove studije su pokazali da je hepcidin oblika savijene ukosnice sa 8 cisteinskih ostataka koji su povezani pomoću 4 disulfidna mosta (41). Savijen oblik ukosnice se obezbeđuje pomoću dve disulfidne veze, dok preostale dve veze spajaju paralelne β jedinice hepcidina (Slika 4) (41, 42). *In vitro* ispitivanja na disulfidnim vezama su pokazala da one ne utiču direktno na aktivnost hepcidina, već im je uloga u održavanju stabilnosti peptida (43).



Slika 4. Sekvenca aminokiselina i model osnovne forme humanog hepcidina. Amino-terminalni deo je obeležen sa N, a karboksi-terminalni sa C. Disulfidni mostovi su obeleženi žutim, bazne aminokiseline plavim, a kisele crvenim. Obrazac disulfidnih veza između 8 cisteina je takođe prikazan u aminokiselinskoj sekvenci. Preuzeto i prilagođeno od (42)

In vivo i *in vitro* ispitivanja strukture i funkcije hepcidina su pokazala da amino-terminalnom degradacijom hepcidina-25 nastaju manje izoforme (hepcidin-24, 22 i 20) i da izoforma od 20 aminokiselina nema ulogu u metabolizmu gvožđa, odnosno da je bioaktivnost

hepcidina u regulaciji metabolizma gvožđa isključivo rezervisana za peptid od 25 aminokiselina (21, 23, 43). Rezultati pomenutih istraživanja su ukazala da su pet aminokiselina lociranih na amino-terminalnom kraju neophodne za aktivnost ovog hormona tj. njegovo vezivanje za feroportin (21, 23, 44, 45). *In vitro* ispitivanja su pokazala da jedino hepcidin-20 ispoljava antimikrobnu aktivnost i to u koncentracionom opsegu koji je 10 puta viši od nivoa koji je prisutan kod zdravih individua (5, 7). Ova saznanja bacaju sumnju da li *in vivo* koncentracija hepcidina može dostići nivoa neophodne za antimikrobnu aktivnost, odnosno da li ova funkcija hepcidina zaista ima biološki značaj ili je samo rudimentarna u svom evolucionom poreklu (46).

1.4.2. Molekularne osnove sistemske homeostaze gvožđa

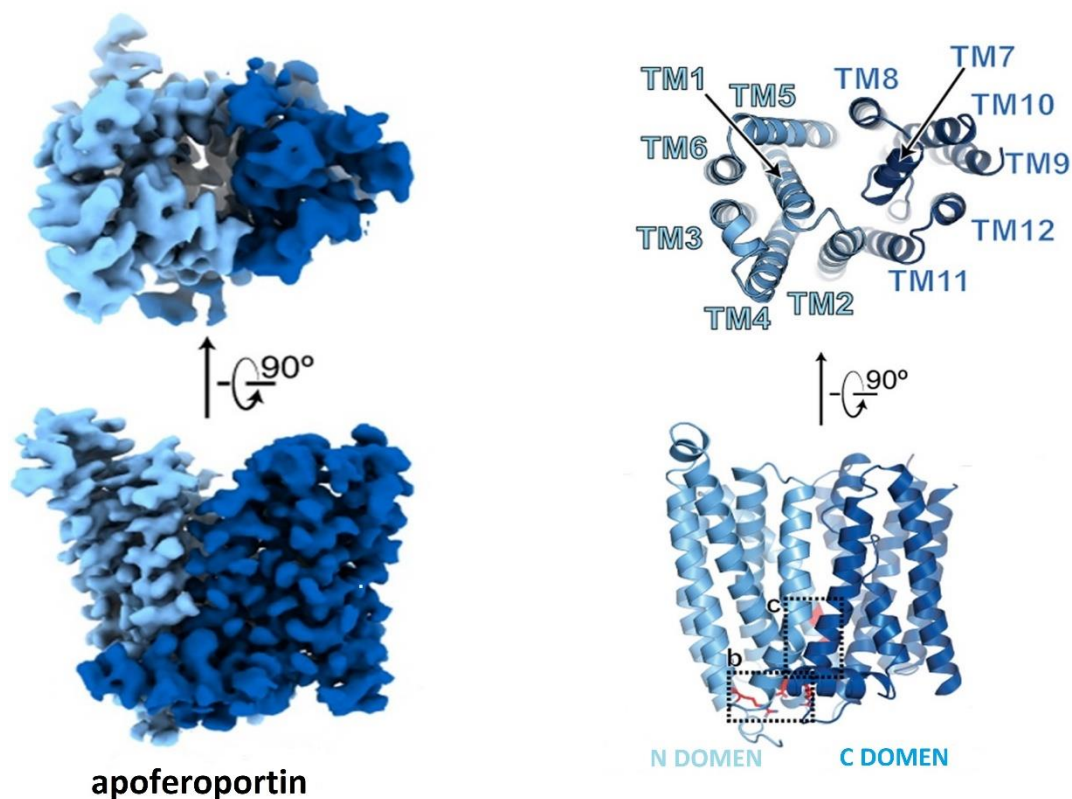
1.4.2.1. Mehanizam dejstva hepcidina-25

Nivo gvožđa u organizmu regulisan je pre svega na nivou apsorpcije i u tom procesu jetra ima centralnu ulogu. Apsorpcija i distribucija gvožđa u tkivima je u osnovi kontrolisana interakcijom hepatičnog hormona hepcidina sa feroportinom. Skoro istovremeno sa otkrićem hepcidina, feroportin je identifikovan kao transportni protein gvožđa koji je eksprimiran na bazolateralnoj površini duodenalnih enterocita, membranama retikuloendotelinih makrofaga, hepatocita i sinciciotrofoblasta placentе (11, 47-49) gde funkcioniše i kao receptor za hepcidin i kao jedini poznati membranski transporter za efluks gvožđa (Slika 2) (21, 23).

Inaktivacija funkcije feroportina usled mutacija kod zebra riba rezultirala je anemijom zbog nedostatka gvožđa kao posledica neadekvatnog transporta gvožđa majke do fetusa (48). Rezultati ispitivanja uslovne delecije feroportina kod miševa potvrdili su važnu funkcionalnu ulogu feroportina u apsorpciji i mobilizaciji gvožđa radi održavanja sistemske homeostaze gvožđa (50-52). Nedavno publikovani rezultati istraživanja su takođe otkrili lokalnu ulogu feroportina u drugim tipovima ćelija, uključujući srčane miocite (53) i eritroidne ćelije (54), u cilju sprečavanja toksičnosti gvožđa u višku. Podaci dobijeni iz kristalne strukture bakterijskog homologa feroportina, računarsko modelovanje, mutacije kod pacijenata i *in vitro* studije su unapredile naše razumevanje o ulozi feroportina u transportu gvožđa i regulaciji njegove aktivnosti od strane hepcidina (11, 43, 55-57).

Feroportin je transmembranski transporter kodiran *SLC40A1* (*eng. SoLute Carrier family 40 member 1*) genom lociranim na hromozomu 2q32 (58). Humani protein je izgrađen od 571 aminokiseline sa molekulskom masom od približno 65 – 70 kD (47-49). Varijacije u

molekulske masi verovatno su posledica tkivno specifičnih glikozilacija. Funkcionalne razlike između formi feroportina koje vode poreklo iz duodenalnih enterocita, hepatocita i makrofaga još uvek nisu razjašnjene (59). Strukturu feroportina čine dva režnja sačinjena od po 6 transmembranskih heliksa (N i C režanj) čiji su N i C krajevi spojeni citoplazmatskom petljom (Slika 5). Dva snopa spirala obuhvataju šupljinu kroz koju se smatra da gvožđe izlazi iz ćelije. Oblik i sličnost sa potpunije okarakterisanim članovima familije transmembranskih proteina sugerišu da feroportin transportuje ćelijsko gvožđe alteracionim mehanizmom, tj. mehanizmom naizmeničnog pristupa u kome feroportin naizmenično prelazi između otvorene unutrašnje konformacije, koja vezuje gvožđe unutar ćelije, i otvorene spoljašnje konformacije koja oslobađa gvožđe u vanćelijski prostor (Slika 5) (11, 21, 28). Gvožđe se transportuje u dvovalentnom obliku (60), ali obezbeđenje energije za transport gvožđa još uvek nije definisano. Budući da se gvožđe transportuje protiv transmembranskog električnog potencijala, a nema dokaza o direktnom povezivanju transporta sa hidrolizom ATP-a, izlazak gvožđa iz ćelije verovatno je povezan sa pasivnim transportom drugog jona ili malog molekula (61).



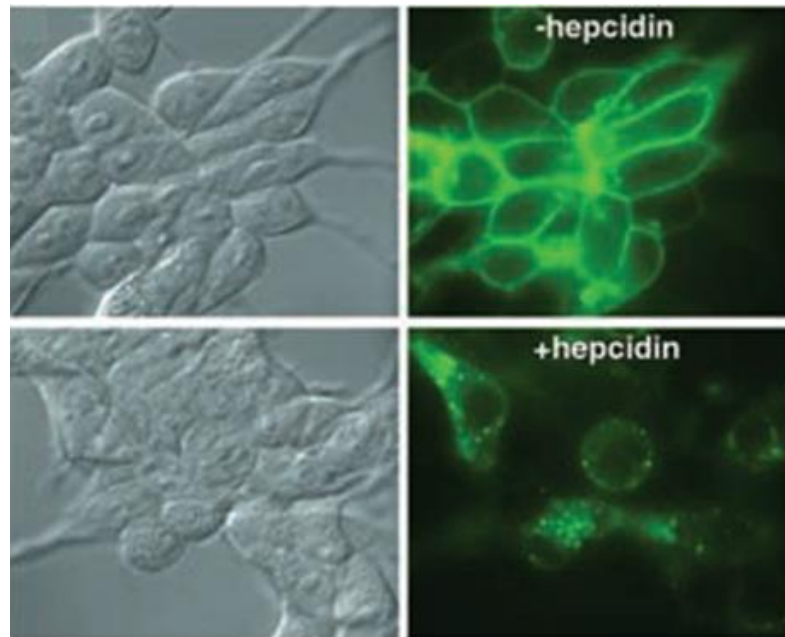
Slika 5. Kriogena elektronska mikroskopija apoferoportina. N i C domeni su obojeni različitim nijansama plave. Ribbon dijagram feroportina (desno) je ukazao na 12 transmembranskih heliksa. Označeni b i c regioni su područja rezidua čije mutacije gubitka funkcije dovode do feroportinske bolesti kod ljudi. Preuzeto i prilagođeno od (28)

Nedavno publikovani rezultati strukturnih analiza su ukazali na postojanje dva mesta za vezivanje dvovalentnih metala (po jedno u svakom režnju) okrenuta prema unutrašnjoj šupljini feroportina (28, 61). Još uvek nije potpuno jasno kako lokacije ovih mesta posreduju u transportu gvožđa. Mesto vezivanja na N-režnju može okupirati kalcijum, i vršiti modulatornu ulogu u transportu gvožđa (61). Iako se sam kalcijum ne transportuje, on je neophodan za transportnu aktivnost feroportina kod ljudi, i smatra se da direktnim vezivanjem za feroportin olakšava konformacionu promenu ključnu za transportni ciklus. Takođe, još uvek nije razjašnjeno kako citoplazmatsko gvožđe namenjeno za izlazak iz ćelije stiže do feroportina. Trenutni dokazi ukazuju da je citoplazmatsko gvožđe pretežno prisutno kao kompleks dvovalentnog gvožđa sa redukovanim glutationom (62), i da se pomenuti kompleks može isporučiti feroportinu preko citoplazmatskog šaperona gvožđa PCBP2 (63).

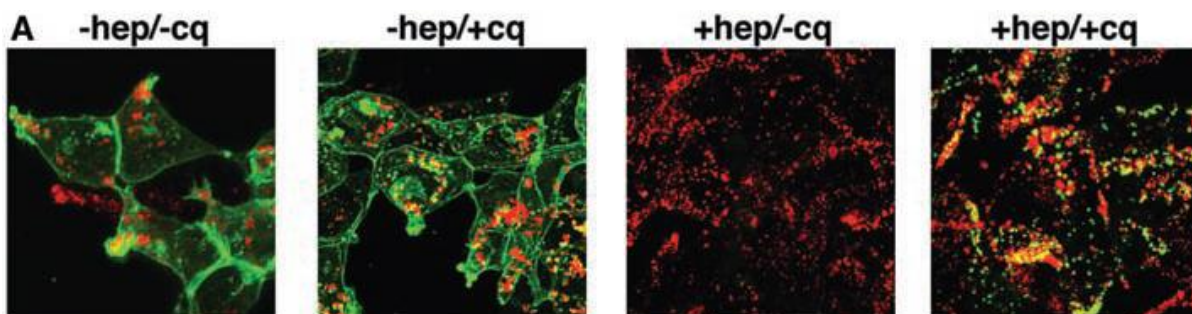
1.4.2.2. Sprega hepcidin-feroportin: Strukturni i funkcionalni aspekti Hepcidin-25 – Feroportin interakcije

Mehanizam regulacije metabolizma gvožđa hepcidinom utvrđen je od strane Elizabete Nemeth i sar. krajem 2004. godine (23). Ova grupa autora je pokazala da se delovanje hepcidina-25 zasniva na blokiranju transporta gvožđa. Vezivanjem za feroportin hepcidin-25 indukuje promenu konformacije feroportina, ubikvitinizaciju višestrukih ostataka lizina na citoplazmatskoj petlji i internalizaciju feroportina (23) (Slika 6). Osim što dovodi do smanjenja koncentracije feroportina na membranama ćelija, hepcidin-25 izaziva i razgradnju feroportina u lizozomalnim vezikulama (Slika 6 i 7) (23, 57).

U svom istraživanju Elizabeta Nemeth i sar. su utvrdili da dodatak hepcidina ćelijskoj liniji HEK293-Fpn izaziva gubljenje feroportina obeleženog fluorescentnim proteinom zelene boje - Fpn-GFP (*eng. Ferroportin-Green Fluorescent Protein*) sa membrane ćelija (Slika 6 i 7). Takođe, ova grupa autora je utvrdila da hlorokin, kao alkalni agens, inhibirajući aktivnost lizozomalne proteaze sprečava hepcidinom posredovanu internalizaciju i povećava fluorescenciju Fpn-GFP u ćelijskim vezikulama. Navedeni rezultati su pokazali da hepcidin-25 dovodi do internalizacije i lizozomalne degradacije Fpn-GFP (Slika 7).

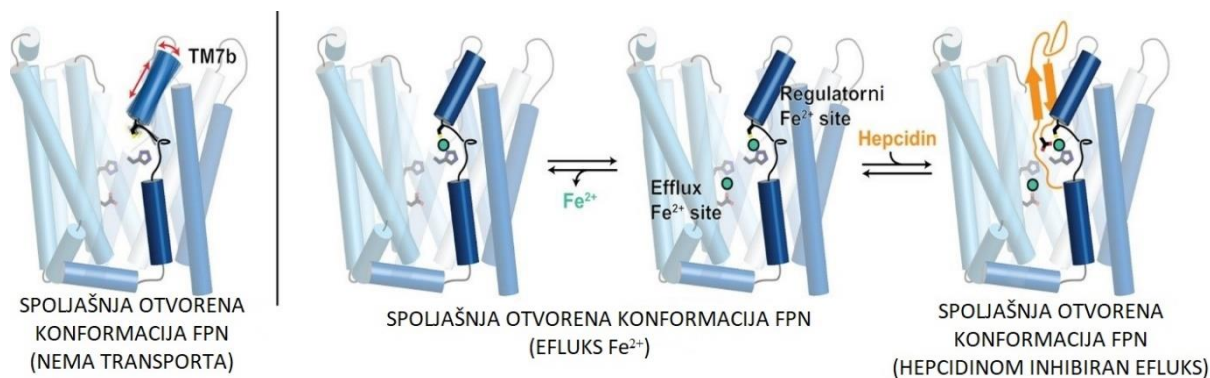


Slika 6. Bioaktivni oblik hepcidina specifično se vezuje za feroportin i indukuje njegovu internalizaciju i degradaciju. Feroportin obeležen fluorescentnim proteinom zelene boje je indukovana ponasteronom tokom 24 časa. Nakon indukcije ćelije su inkubirane tokom 6 časova sa i bez prisustva 0,5 mM prečišćenog humanog hepcidina i ispitane epifluorescentnom mikroskopijom. Preuzeto i prilagođeno od (23)



Slika 7. Hepcidin indukuje lizozomalnu degradaciju Fpn obeleženog fluorescentnim proteinom zelene boje. HEK293-Fpn ćelijska linija je indukovana ponasteronom i inkubirana tokom 2 časa u prisustvu ili odsustvu 100 mM hlorokina, nakon čega su inkubirane tokom 4 časa sa ili bez 0,5 mM hepcidina. Uzorci su obeleženi mišjim antitelima usmerenim ka lizozomalnom markeru Lamp-1 i analizirani metodom imunofluorescence. Žuta boja predstavlja vezu između zelene boje Fpn-GFP i crvene boje Lamp-1. Većina Fpn-GFP je lokalizovana sa lizozomalnim markerom Lamp-1 pri delovanju hepcidina i hlorokina. Preuzeto i prilagođeno od (23)

Novija saznanja ukazuju da osim smanjenja funkcionalne aktivnosti, hepcidin vezuje feroportin u spoljašnjoj otvorenoj konformaciji (*eng. outward-open conformation*) i dovodi do mehaničkog blokiranja puta za izlazak gvožđa iz ćelije (Slika 8) (28, 56).



Slika 8. Model interakcije hepcidina (obežen narandžasto) sa feroportinom (obežen plavo) u kome je njihovo vezivanje zavisno od gvožđa (zeleno). Struktura heliksa koji čine feroportin je prikazana u obliku cilindara povezanih intraćelijskim i ekstraćelijskim petljama. U okviru efluksa gvožđa, region TM7b je konformaciono stabilizovan koordinacijom gvožđa u regulatornom mestu C domena. Vezivanje hepcidina visokom afinitetom za feroportin koji zauzima spoljašnju otvorenu konformaciju zavisi od direktne koordinacije gvožđa u C domenu. Preuzeto i prilagođeno od (28)

Hecpidin ostvaruje ekstenzivni polarni i hidrofobni kontakt sa feroportinom na površini od $\sim 1300\text{\AA}^2$ (28). Napredak u razumevanju strukturne hepcidin-feroportin interakcije potvrdili su jednostavni modeli generisani ciljanom mutagenezom hepcidina i feroportina. Pomenuti modeli pružili su i iznenađujuće nove detalje (28). Naime, nedavna istraživanja strukture feroportina u lipidnom nanodisku pomoću kriogene elektronske mikroskopije (*eng. Cryogenic electron microscopy*) identifikovala su dva mesta za vezivanje metala između N i C domena molekule feroportina (28). U modelu nanodisk membrane (*eng. nanodisc membrane model*), utvrđeno je da karboksilni kraj hepcidina direktno dolazi u kontakt sa dvovalentnim metalom u C domenu feroportina; sa veoma varijabilnom petljom hepcidina koja je uglavnom smeštena ekstracelularno, a relativno očuvani C i N domeni hepcidina duboko „zakopani“ u centralnoj šupljini feroportina (Slika 8). Model je ukazao i na važnu neočekivanu karakteristiku da suspektno mesto vezivanja hepcidina u C-režnju, koje je usmereno na kritično važan C325 tiol cistein, koristi atom gvožđa za koordinaciju vezivanja hepcidina (28).

Strukturne i biohemijske studije Christian i sar. (28) su pokazale da je vezivanje hepcidina za feroportin u velikoj meri potencirano samim gvožđem, najverovatnije zbog pomenutog stabilizacionog efekta koje gvožđe ima na vezujuće mesto hepcidina na feroportinu (Slika 8). Sa gvožđem, afinitet vezivanja hepcidina se povećava 80 puta i ulazi u okvire određene kod zdravih odraslih osoba (28). Još uvek nije jasno kako to doprinosi fiziološkoj funkciji hepcidina, ali može se pretpostaviti da u stanju fiziološke homeostaze gvožđa ovaj mehanizam može omogućiti hepcidinu da selektivno vezuje i reguliše molekule feroportina koje aktivno transportuju gvožđe i koje su „ispuunjene gvožđem“, dok istovremeno šteti molekulama feroportina locirane na ćelijama sa malom transportnom aktivnošću (21). Jedan

pokazatelj da ovaj mehanizam može imati fiziološki efekat je nedavno opisana inhibicija hepcidinom posredovane degradacije ferroportina pomoću intracelularnog helatora gvožđa – deferiprona, ali ne i ekstracelularno delujućeg helatora – deferoksamina (64).

Dakle, izlazak gvožđa iz ćelija je kontrolisan hepcidinom kroz dva poznata mehanizma: okluzijom otvorene spoljašnje konformacije ferroportina hepcidinom (28, 56), i hepcidinom indukovanom endocitozom i razgradnjom ferroportina (23). Smatra se da bi mehanizam okluzije bio efikasan pri koncentracijama hepcidina gde većina molekula ferroportina ostaje blokirana tokom dužeg vremenskog perioda, i bio bi brzo reverzibilan nakon sniženja koncentracije hepcidina. Mehanizam endocitoze može biti pokrenut čak i prolaznim vezivanjem hepcidina za ferroportin, što bi izazvalo trajno uklanjanje ferroportina sa ćelijske površine i zahtevalo bi resintezu ferroportina za obnavljanje transporta gvožđa. Shodno navedenom, očekivano je da će se drugi mehanizam dogoditi pri nižim koncentracije hepcidina i imati produžen efekat, čak iako se koncentracije hepcidina naknadno snize. Iako se hepcidin ubrizgan u miševе zadržava u cirkulaciji samo nekoliko minuta, efekat sniženja koncentracije gvožđa u plazmi traje tokom 24 – 48 sati, podržavajući značaj endocitnog mehanizma za fiziološku funkciju ferroportina (65).

Regulacija ferroportina hepcidinom pomoću endocitnog mehanizma podseća na opštu endocitozu receptora izazvanu ligandom. Čini se da ovaj mehanizam zahteva konformacionu promenu u ferroportinu izazvanu hepcidinom koja pokreće ubikvitinizaciju lizinom bogatog citoplazmatskog segmenata koji povezuje dva 6-spiralna domena ferroportina (57). Ubikvitirani ferroportin se zatim usmerava na razgradnju u lizozomima i proteazomima. Nedavna studija (66) pruža ubedljive dokaze da je Rnf217 važna E3 ubikvitin ligaza koja aktivira razgradnju ferroportina kao odgovor na vezivanje hepcidina.

Vezivanje hepcidina za ferroportin će i „uhvatiti“ transporter u otvorenoj spoljašnjoj konformaciji i limitirati izlazak gvožđa. Obe aktivnosti dovode do akutnog smanjenja efluksa gvožđa kao što je i ranije pokazano (56). Povišene koncentracije hepcidina verovatno prevazilaze ovu regulatornu strategiju i dovode do razgradnje ferroportina čak i u odsustvu aktivnog efluksa gvožđa. U skladu sa novim modelom regulacije ferroportina hepcidinom, gde su samo molekule ferroportina opterećene gvožđem selektovane za razgradnju, potenciranje aktivnosti hepcidina gvožđem može imati neposredne posledice za razvoj mimetika hepcidina u kliničkim studijama (67).

Gore pomenutim mehanizmima hepcidin-25 reguliše izlazak gvožđa iz ćelija tj. ulazak gvožđa u sistemsku cirkulaciju: iz enterocita koji apsorbuju gvožđe iz hrane, iz makrofaga koje su uključene u recikliranje gvožđa iz ostarelih eritrocita, i iz hepatocita u kojima je gvožđe

deponovano (Slika 2) (10, 21, 23, 68). Dakle, hepcidin utiče na distribuciju gvožđa u telu, sa povećanim koncentracijama hepcidina dolazi do smanjenog ulaska gvožđa u cirkulaciju i povećane količine gvožđa zarobljenog u ćelijama koje eksportuju gvožđe (10, 21, 23, 68).

1.5. Regulacija sinteze hepcidina

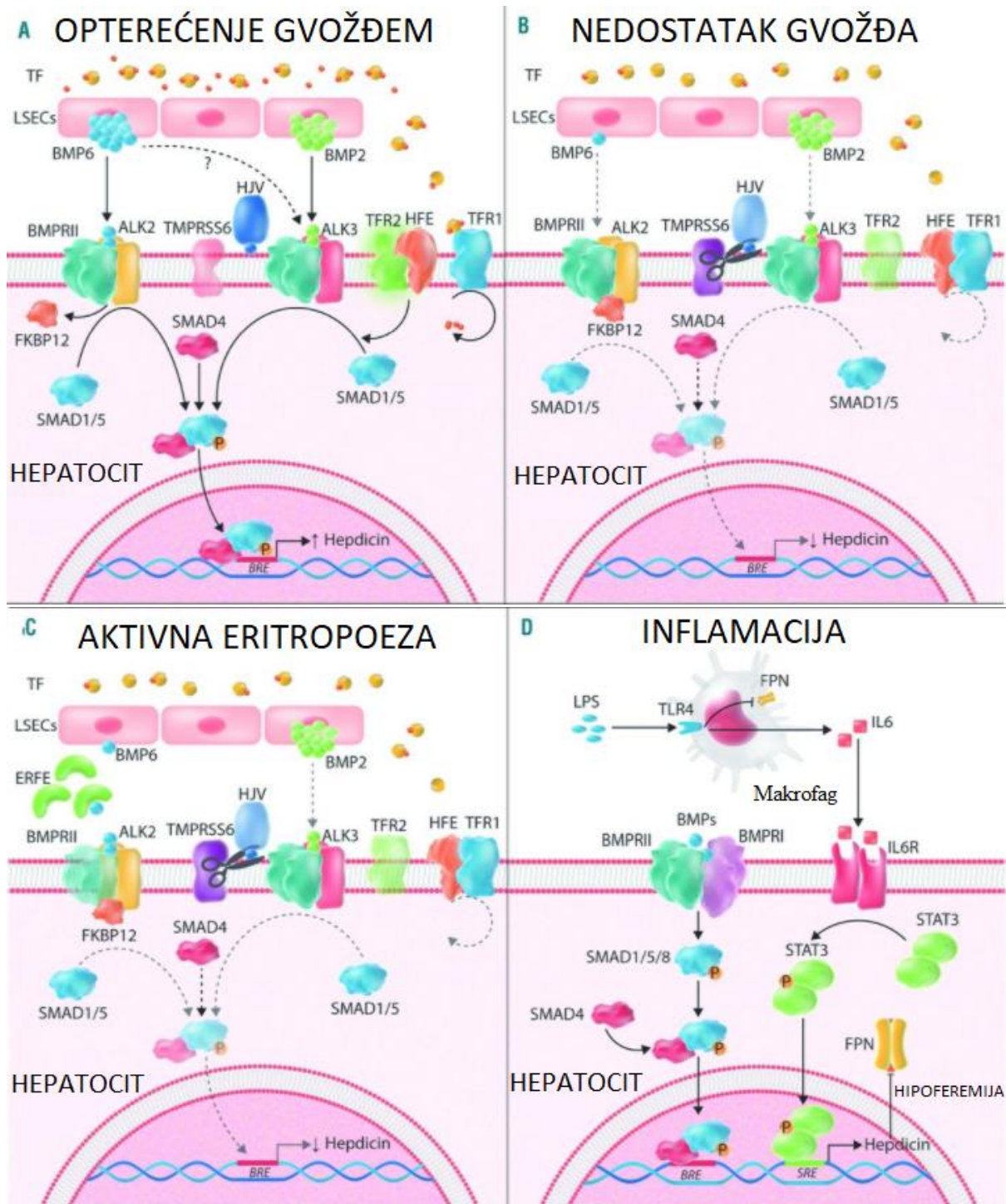
Gvožđe je neophodan element za brojne fiziološke procese, ali je takođe i potencijalno toksično; i kao takvo je striktno kontrolisano na ćelijskom i sistemskom nivou. U cilju očuvanja systemske homeostaze gvožđa, komunikacija između ćelija za čiju sintezu je neophodno gvožđe (eritroidnih prekurzora), depoa gvožđa (hepatocita i tkivnih makrofaga) i ćelija koje apsorbuju gvožđe iz hrane (enterocita) mora biti precizno regulisana (10). Regulatorni proteini gvožđa post-transkripciono kontrolišu gene koji kodiraju proteine zadužene za moduliranje unosa, recikliranje i skladištenje gvožđa, a koji i sami regulišu homeostazu gvožđa (10).

Sposobnost hepcidina da kontroliše ekspresiju i aktivnost feroportina pruža molekularno objašnjenje kako hepcidin funkcioniše kao ključni hormon za koordinaciju signala od deponovanog i transportnog gvožđa, eritropoetske aktivnosti i inflamacije u cilju regulacije systemske homeostaze gvožđa (Slika 1) (11). Različiti faktori utiču na ekspresiju *HAMP* gena: sadržaj gvožđa u organizmu, eritropoetska aktivnost, anemija, hipoksija, oksidativni stres i inflamacija (10, 11, 69). Povećanje količine deponovanog gvožđa povećava ekspresiju hepcidina, čime se inhibira feroportin i ograničava ulazak gvožđa u krvotok (Slika 9). Hpcidin je regulisan ne samo deponovanim gvožđem, već i naglim porastom koncentracije gvožđa u plazmi, čak i kada su zalihe gvožđa nepromenjene (70). Navedeni sistem regulacije objašnjava zašto koncentracija gvožđa u plazmi ostaje relativno stabilna uprkos brzom prometu gvožđa. Inflamacija takođe indukuje sintezu hepcidina, čime se inhibira feroportin da bi se ograničila dostupnost gvožđa patogenima (71). Proinflamatorni citokin interleukin-6 (IL-6), jedan je od glavnih stimulatora sinteze hepcidina-25 (72). Nasuprot navedenim uticajima, nedostatak gvožđa i eritropoetska aktivnost suprimiraju sintezu hepcidina, pospešujući na taj način funkciju feroportina da bi se obezbedila dostupnost gvožđa za potrebe eritropoeze i druge bitne funkcije (Slika 9) (11, 68, 73).

Nakon otkrića „osovine” hepcidin-feroportin, postalo je jasno da prekomerna ili nedovoljna sinteza hepcidina ima centralnu ulogu u većini poremećaja systemske homeostaze gvožđa. Suprimiranje ekspresije hepcidina anemijom ili hipoksijom ima fiziološku ulogu u cilju povećanja dostupnosti gvožđa za potrebe eritropoeze, dok sa druge strane prekomerna

supresija hepcidina neefikasnom eritropoezom doprinosi patološkom nagomilavanju gvožđa u talasemiji i anemiji sa opterećenjem gvožđa. Budući da indukcija sinteze hepcidina može biti zaštitna sekvestracijom gvožđa tokom infekcije, prekomerna indukcija sinteze hepcidina može ograničiti dostupnost gvožđa za potrebe eritropoeze kod anemije u sklopu hroničnih inflamatornih bolesti (11).

Šematski prikaz modela regulacije sinteze hepcidina u prekomernom opterećenju gvožđem, nedostatku gvožđa, aktivnoj eritropoezi i inflamaciji prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Šematski prikaz modela regulacije sinteze hepcidina od strane BMP2/6-SMAD puta u (A) preteranom opterećenju gvoždem (B) nedostatku gvožđa, (C) aktivnoj eritropoezi (D) i inflamaciji. Preuzeto i prilagođeno od (74)

(A) Morfogenetski protein kostiju (BMP) 2, sintetisan od strane endotelnih ćelija jetre (LSECs), vezuje tip II BMP receptora koji fosforiliše BMP receptore tip I (ALK3) koji zatim aktiviraju put SMAD1/5/8. SMAD1/5/8 se nakon vezivanja za SMAD4 translocira u nukleus i vezuje za BMP responsive elemente (BRE) u promoteru hepcidina. U opterećenju gvoždem povećana koncentracija transferina zasićenog gvoždem razdvaja hemohromatozni protein (HFE) od transferinskog receptora (TFR) 1 i na taj način omogućava preuzimanje gvožđa, stabilizuje TFR2 i potencira signalizaciju ALK3. HJV deluje kao koreceptor BMP, dok je uloga ostalih

hemohromatoznih proteina HFE i TFR2 u putu aktivacije i dalje nedovoljno razjašnjena. Gvožđe povećava produkciju BMP6 pomoću LSEC, čime se aktivira ALK2 i verovatno ALK3.

(B) Tokom deficita gvožđa *TMPRSS6* je stabilizovana na površini ćelije (75), odvaja HJV (76) i inaktivira BMP2-ALK3 granu puta. TFR2 je destabilizovan nedostatkom transferina zasićenog gvožđem, i HFE vezuje TFR1 (77). Put BMP6 je neaktivan u odsustvu liganda i takođe ako je ALK2 inaktivirana vezivanjem FKBP12 (78). Pomenuti mehanizmi zajedno sa epigenetskom regulacijom (79), dovode do suprimiranja ekspresije hepcidina.

(C) Aktivna eritropoeza potencirana eritropoetinom zahteva dostupnost velike količine gvožđa: niska koncentracija serumskog kao i transportnog gvožđa suprimira BMP2-ALK3 put, dok se BMP6 i drugi BMP odvajaju eritroferonom (ERFE) sintetisanim od strane eritroidnih prekurzora (80). Prethodno navedeni procesi dovode do inhibicije sinteze hepcidina.

(D) Makrofage stimulisane inflamacijom [označeno kao lipopolisaharid (LPS) preko toll-like receptora 4 (TLR4)], proizvode interleukin-6 (IL6), koji stimuliše Janus kinazu - signalni put i aktivator transkripcije 3 (JAK-STAT3) i u saradnji sa BMP-SMAD putem dovodi do povećane sinteze hepcidina.

1.5.1. Regulacija hepcidina gvožđem: saznanja dobijena iz HH i IRIDA

Nemogućnost povišene koncentracije gvožđa da na odgovarajući način ushodno reguliše hepcidin dovodi do razvoja hereditarne hemohromatoze (HH). HH može biti posledica ne samo mutacija autozomno recesivnog karaktera gena *HAMP* ili *SLC40A1* već i gena koji kodiraju regulatorne proteine: hemohromatozni protein (HFE), transferinski receptor 2 ili hemojuvelin (HJV) (81-83). Svi pacijenti i životinjski modeli sa gore navedenim poremećajima pokazuju deficit hepcidina i opterećenje gvožđem, što sugerise da je ključna funkcija ovih proteina regulisanje sinteze hepcidina u odgovoru na koncentraciju gvožđa (10, 11). Mutacije gena i tipovi HH prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Hereditarna hemohromatoza: mutacije gena i tipovi

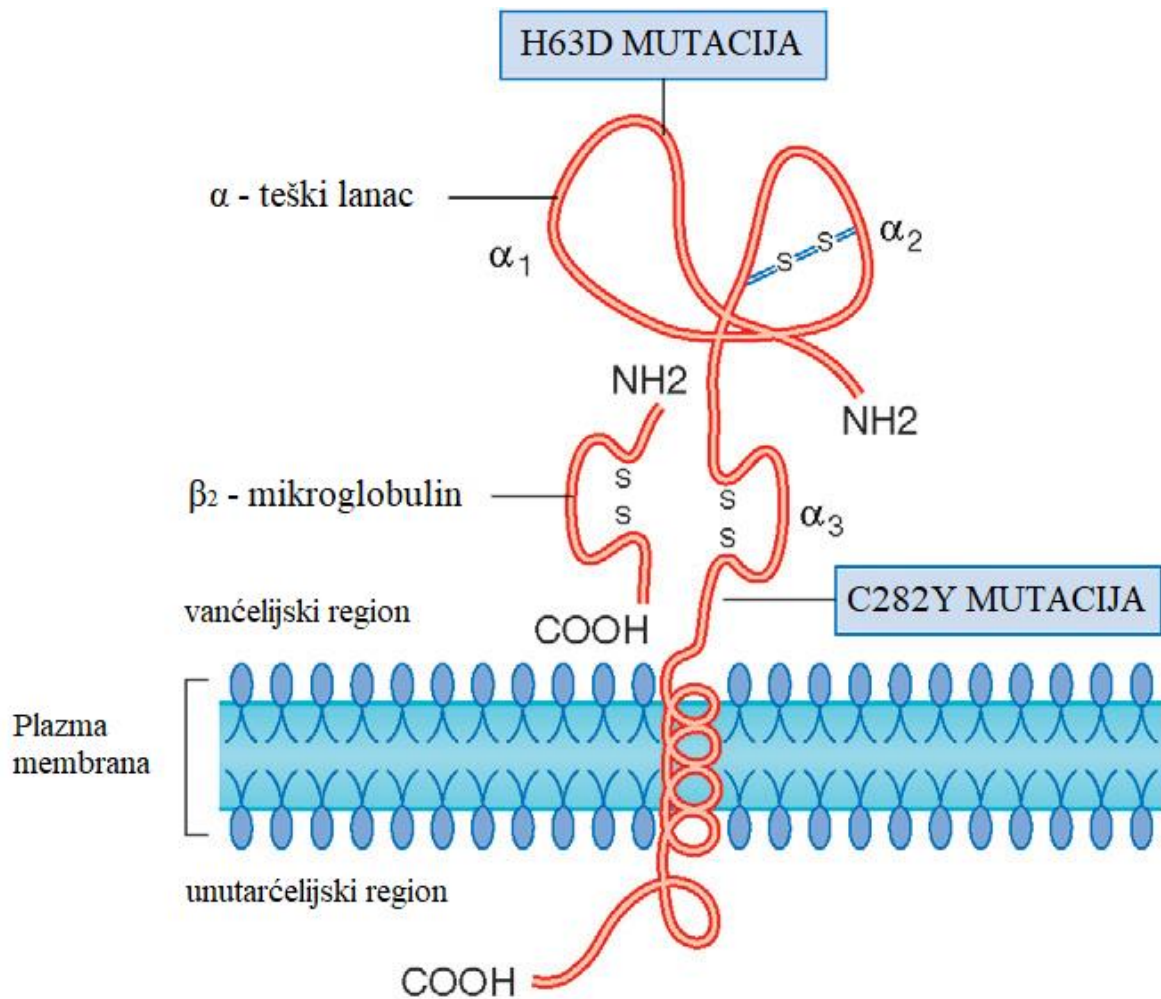
HH povezana sa mutacijom u genu <i>HFE</i>	
<i>C282Y</i> homozigoti (94%)	Tip 1
<i>C282Y/H63D</i> heterozigoti (4%)	
<i>H63D</i> homozigoti (1%)	
HH koja nije posledica mutacija u genu <i>HFE</i>	
Mutacija <i>HAMP</i> ili <i>HJV</i> gena	Tip 2A (<i>HJV</i>) (Juvenilna)
	Tip 2B (<i>HAMP</i>) (Juvenilna)
Mutacija <i>TFR2</i> gena	Tip 3
Mutacija <i>SLC40A1</i> gena	Tip 4 (Feroportinska bolest)

HH- Hereditarna hemohromatoza. Preuzeto i prilagođeno od (84, 85)

Kato i sar. (86) su utvrdili postojanje prekomernog nagomilavanja gvožđa u jetri, pankreasu i koštanoj srži sa istovremeno visokom koncentracijom serumskog gvožđa kod jedne porodice japanskog porekla. Genetskim testiranjem je utvrđeno da je mutacija u genu koji kodira sintezu feritina - *FTH-1*, odgovorna za opterećenje gvožđem u pomenutim organima, a navedeni poremećaj je predložen za tip 5 hereditarne hemohromatoze (86).

Uloga HFE u apsorpciji gvožđa je utvrđena istraživanjem strukture i funkcije ovog proteina kod zdravih i osoba obolelih od HH. Struktura HFE molekula je vrlo slična MHC molekulima klase I. HFE je heterodimer izgrađen od teškog α lanca, kog kodira gen *HFE* lociran na kratkom kraku hromozoma 6, i nekovalentno vezanog lakog lanca – β 2-mikroglobulina koji je neophodan za stabilizaciju molekula (Slika 10). Lanac α sadrži tri domena: α 1, α 2 i α 3 (84, 87). HFE je eksprimiran na površini mnogih ćelija, uključujući makrofage i matične ćelije u kriptama duodenuma (84, 88).

Najzastupljeniji polimorfizam *HFE* gena C282Y rezultira zamenom cisteina tirozinom na poziciji 282 u α 3 domenu (Slika 10, Tabela 1). Ova zamena aminokiselina izaziva destabilizaciju veze teškog i lakog lanca, protein ne može da dosegne površinu ćelije, sprečava se interakcija sa hepcidinom i transferinskim receptorima što zajedno dovodi do gubitka funkcije HFE (87). Homozigoti za mutantnu formu HFE apsorbuju 2-3 puta više gvožđa iz hrane nego što je normalno, usleg čega dolazi do preteranog nagomilavanja gvožđa prevashodno u parenhimskim ćelijama jetre, srca i pankreasa. Drugi po učestalosti polimorfizam *HFE* gena uključuje zamenu histidina asparaginskom kiselinom na poziciji 63 proteinske sekvence HFE (H63D). H63D polimorfizam HFE može dovesti do poremećaja metabolizma gvožđa i izazvati nagomilavanje gvožđa u depoima kada je udružen sa polimorfizmom C282Y HFE (87, 89) (Tabela 1, Slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz HFE proteina sa regionima C282Y i H63D mutacija. Preuzeto i prilagođeno od (84)

Gen *TMPRSS6*, lociran na hromozomu 22q12-q13, kodira membransku proteazu matriptazu-2 koja ima važnu funkcionalnu ulogu u suprimiranju ekspresije *HAMP* gena u odgovoru na deficit gvožđa (76, 90). Gubitak funkcije *TMPRSS6* izaziva preveliku produkciju hepcidina-25 i redak tip anemije koju karakteriše odsustvo odgovora na terapiju oralnim preparatima gvožđa sa parcijalnim odgovorom na intravensku administraciju preparata gvožđa (eng. *iron-refractory iron-deficiency anemia*, IRIDA) (91, 92). Uobičajene varijante *TMPRSS6* su povezane sa alteracijama u eritrocitnim i parametrima statusa gvožđa (93, 94). Prema dbSNP arhivi genetskih varijacija (NCBI), rs855791 identifikuje supstituciju timina (T) > C na poziciji 2207 *TMPRSS6* (odgovara komplementarnoj promeni A > G), što rezultira „missense“ zamenom valina (V) alaninom (A) na poziciji 736 proteinske sekvence (varijanta A736V). Ova pozicija je locirana blizu katalitičkog i mesta vezivanja matriptaze-2 (95) Rezultati nedavnih istraživanja su ukazali da polimorfizam rs855791, koji rezultira varijantom A736V matriptaze-

2, predstavlja značajnu determinantu statusa gvožđa i snižene koncentracije hemoglobina u populaciji zdravih ispitanika (76, 93, 94).

Imajući u vidu saznanja dobijena iz HH i IRIDA, ciljanje funkcije hepcidina i/ili feroportina je postalo atraktivna nova terapijska strategija za pomenute poremećaje metabolizma gvožđa, sa efikasnošću pokazanom na mnogim životinjskim modelima, a brojni kandidati su sada prevedeni u kliničke studije (96, 97). Razumevanje genetske i molekularne osnove poremećaja homeostaze gvožđa takođe je donelo važan uvid u mehanizam regulacije hepcidina različitim stimulusima i otvorilo dodatne terapijske mogućnosti koje su usmerene na sintezu hepcidina (11).

1.5.2. Regulacija hepcidina HJV i BMP-SMAD putem

U osnovi modela mehanizma regulacije i kontrole transkripcije hepcidina nalaze se: 1) Receptor morfogenetskog proteina kostiju (*eng. Bone morphogenetic protein*, BMP) i njegove signalne komponente (BMPs) u sprezi sa SMAD putem; 2) HJV koji je ligand BMP receptora specifičan za gvožđe, a koji povećava senzitivnost BMP receptora za BMPs; 3) informacije o deponovanom gvožđu u jetri koje se reflektuju povećanom produkcijom BMP6, koji je ligand i aktivator BMP receptora (Slika 9) i 4) ćelijske koncentracije gvožđa koje se reflektuju sistemom IRP (*eng. iron regulatory protein*) / IRE (*eng. iron responsive element*) na informacionoj RNK odgovarajućeg proteina (10, 11).

Genetska istraživanja su identifikovala ključne molekule BMP-SMAD signalnog puta: ligandi BMP6 (98) i BMP2 (99), receptori tip I: ALK2 i ALK3 (100), receptori tip II: ACVR2A i BMPR2 (101), receptorom aktivirani SMAD (R-SMADs) 1 i 5 (102) i SMAD4 (103) (Slika 9). Sistemski ili tkivno specifični nedostatak ovih molekula rezultira nedostatkom hepcidina i HH kod miševa. SMAD7 i SMAD6 su inhibitorne SMAD molekule koje su indukovane BMP-SMAD signalnim putem mehanizmom povratne sprege. Uloga SMAD7 i SMAD6 je u ometanju funkcije receptora tipa I ili otežavanju formiranja SMAD kompleksa (104).

Dok većina pomenutih proteina reguliše hepcidin direktno u hepatocitima, BMP2 i BMP6 ligandi potiču iz endotelnih ćelija jetre (*eng. liver sinusoidal endothelial cells*, LSECs), gde imaju parakrine efekte na HJV i kompleks BMP receptora (105, 106). Rezultatima skorašnje studije pokazano je da BMP2 i BMP6 *in vivo* funkcionišu udruženo, najverovatnije kao heterodimer (107). Relevantnost uticaja ovih molekula kod ljudi potvrđuju objavljeni rezultati o višoj koncentraciji feritina kod pacijenata sa HFE hemohromatozom i uobičajenim

polimorfizmom BMP2 (108) i prekomernim nagomilavanjem gvožđa kod pacijenata sa heterozigotnim mutacijama u prodomenu BMP6 (109).

HJV je, kao i njegovi homolozi porodice RG molekula (*eng. repulsive guidance molecule family homologs*) RGMA i RGMB (110), prepoznat po funkciji koreptora BMP-SMAD (*eng. small mothers against decapentaplegic*) signalnog puta (111). Ovo otkriće je ukazalo da BMP-SMAD signalni put ima ulogu glavnog transkripcionog regulatora ekspresije hepcidina u hepatocitima (111) (Slika 9). HJV se vezuje direktno za BMP ligande na membrani hepatocita i olakšava formiranje aktivnog signalnog kompleksa koji sadrži BMP receptore tip I i II (111, 112). Ovaj signalni kompleks fosforiliše R-SMADs, koji se vezuju za zajednički medijator SMAD4 i translociraju u nukleus gde vezuju dva specifična elementa na promoterskom regionu hepcidina (113) i iniciraju transkripciju. BMP signalizacija takođe može uticati na ekspresiju hepcidina epigenetskim mehanizmima (103).

Iako su pojedinačne komponente BMP-SMAD multimernog kompleksa identifikovane, potpuno razumevanje prirode signalnog puta u regulaciji ekspresije hepcidina i dalje je nepoznato. Dok HJV pojačava BMP indukciju sinteze hepcidina u ćelijskim kulturama i kod životinja, HJV nije potreban za BMP2 ili BMP6 signalizaciju, budući da ovi ligandi i dalje mogu indukovati hepcidin, mada manje snažno, u primarnim *HJV* - / - hepatocitima (111). Jedna hipoteza sugerise da HJV pospešuje vezivanje BMP-a na ćelijskoj površini, a nakon internalizacije receptori tip I zamenjuju HJV u kiselom endozomskom odeljku koji pogoduje interakcijama BMP i tip I receptora u odnosu na interakcije BMP-HJV (112). Ova hipoteza čeka na potvrdu u funkcionalnim studijama.

HJV može da stupi u interakciju sa drugim proteinima koji moduliraju optimalnu BMP-SMAD signalnu transdukciju u odgovoru na gvožđe, kao što su neogenin (112), HFE, TFR2 i matriptaza-2 (76, 114). Pokazano je da neogenin vezuje poseban domen liganda BMP (112) i može sudelovati u moduliranju signalizacije pri formiranju i lokalizaciji BMP kompleksa (115), što se u izvesnoj meri može objasniti nedostatkom hepcidina i preopterećenjem gvožđa na životinjskom modelu (116).

Još jedno otvoreno pitanje uključuje relativne uloge pojedinačnih BMP liganda i receptora, bilo da su aktivirani pod različitim uslovima, imaju različitu efikasnost signalizacije, ili uključuju heteromerske ligande ili komplekse receptora. BMP tip II receptori imaju potpuno redundantnu funkciju, budući da hepatociti sa jednostrukim gubitkom funkcije bilo *ACVR2a* ili *BMPRII* ne utiču na homeostazu gvožđa (101). Nasuprot tome, hepatociti sa gubitkom

funkcije bilo kog BMP tip I receptora ispoljavaju HH, mada je gubitak funkcije *ALK3* ispoljio jače izražen fenotip nego gubitak funkcije *ALK2*, sugerišući bar neke funkcije koje se ne preklapaju (100). Trenutni model sugerise da je *ALK2* uglavnom uključen u BMP6 zavisnu ushodnu regulaciju hepcidina u uslovima prekomernog opterećenja gvoždem, a inhibiran je imunofilinom FKBP12 (78), dok *ALK3* održava bazalnu ekspresiju hepcidina (117) i signalizaciju u odgovoru na BMP2 (Slika 9). Endotelne ćelije bez funkcije bilo *BMP2* ili *BMP6* takođe ispoljavaju HH, što je u skladu sa neredundantnim ulogama (105, 106). Smatra se da regulacija *HAMP* gena od strane BMP2/6 predstavlja mehanizam povratne sprege koji štiti od prekomernog nagomilavanja gvožđa i posledičnog oštećenja tkiva (73).

1.5.3. Regulacija hepcidina pomoću HFE i TFR2

Poput mutacija u genu koji kodira HJV, hepcidin ili HFE, i mutacije u genu za TFR2 takođe dovode do HH, mada sa manje izraženim opterećenjem gvoždem koje se javlja kasnije u životu (81). TFR2 je receptor za transferin sa ograničenijom distribucijom u tkivima i nižim afinitetom od primarnog receptora za unos gvožđa vezanog za transferin-TFR1 (118). I HFE i TFR2 stimulišu ekspresiju hepcidina kroz funkcionalnu interakciju sa signalnim putem SMAD (Slika 9) (119). Prekomerna ekspresija izazvana *in vitro* je pokazala da se HFE i TFR2 vezuju jedan za drugi (120) i za HJV (114). Smatra se da su ove proteinske interakcije mehanizam pomoću kojih HFE i TFR2 utiču na sintezu hepcidina. Takođe je pokazano da HFE vezuje *ALK3* i povećava njegovu stabilnost ometajući ubikvitinizaciju i razgradnju (117). Da li se ove proteinske interakcije dešavaju sa endogeno eksprimiranim proteinima *in vivo* ostaje neizvesno.

Dosadašnja saznanja dobijena iz genetskih studija ukazuju da se funkcije ovih proteina ne preklapaju u potpunosti i da neki proteini imaju dominantniju ulogu od drugih. Na primer, kombinovan gubitak funkcije/mutacija *HFE* i *TFR2* rezultirao je ozbiljnijim opterećenjem gvožđa u odnosu na pojedinačni gubitak funkcije/mutacije bilo kog gena i kod miševa i kod ljudi (119, 121). Ispitivanja na miševima sugerisu da HFE može indukovati hepcidin u odsustvu TFR2 (77). Gubitak funkcije HJV, TFR2, ili β_2 mikroglobulina izazvao je dodatno prigušenje SMAD signalizacije i ekspresije hepcidina kod miševa bez funkcije BMP6 (122), što sugerise da ovi proteini mogu modulirati koncentraciju hepcidina koristeći BMP2 (ili druge BMP ligande) u odsustvu BMP6. Posmatrano zajedno, podaci ukazuju da HJV, HFE i TFR2 na istom putu teže istom cilju, tj. moduliranju BMP-SMAD signalizacije i time hepcidin (11). Iako svi

proteini moraju biti prisutni za optimalnu signalizaciju, čini se da je više vrsta kompleksa BMP liganda/receptora/pomoćnih proteina sposobna da stimuliše sintezu hepcidina u određenoj meri, a ni jedna pojedinačna proteinska komponenta nije apsolutno neophodna. Zato gubitak funkcije bilo kog proteina rezultira modulatornim efektom, a ne potpunim ukidanjem signalizacije (11). TFR2 takođe može uticati na koncentraciju hepcidina izvan moduliranja BMP-SMAD puta. Naime, TFR2 je eksprimiran i u eritroidnim ćelijama gde ima funkcionalnu ulogu u moduliranju signalizacije eritropoetina i eritropoezi (123) tj. u regulaciji hepcidina posredovanoj eritroidnim signalom (123).

1.5.4. Regulacija hepcidina posredstvom matriptaze-2

Smatra se da matriptaza-2 inhibira transkripciju hepcidina modulirajući centralni signalni put BMP-HJV-SMAD (Slika 9) (76). U osnovi mehanizma delovanja matriptaze-2 je vezivanje i odvajanje HJV (koreceptora BMP-a) sa površine membrane što rezultira prigušenjem BMP-SMAD signalizacije (76, 90). Nedavno je pokazano da prekomerna ekspresija matriptaze-2 u hepatocitima smanjuje ekspresiju hepcidina kod miševa bez funkcije gena *HJV*, što ukazuje na postojanje alternativnog mehanizma, nezavisnog od HJV, kojim matriptaza-2 suprimira sintezu hepcidina (124). U ovoj studiji je takođe pokazano da prekomerna ekspresija matriptaze-2 u *in vitro* sistemima odvaja i druge članove BMP-SMAD signalnog aparata, uključujući ALK3, ALK2, ACVR2A, BMPR2, HFE, TFR2 i neogenin (124).

1.5.5. Gvožđe u jetri i hepcidin

Literaturni podaci govore u prilog postojanja dva različita signala gvožđa koja regulišu sintezu hepcidina u hepatocitima i to: akutne promene koncentracije gvožđa u cirkulaciji i promene količine deponovanog gvožđa (70, 125). Smatra se da oba signala stimulišu sintezu hepcidina aktiviranjem BMP-SMAD signalne kaskade, ali kroz različite mehanizme (Slika 9). Opterećenje gvožđem povećava količinu gvožđa vezanog za transferin i koncentraciju slobodnog gvožđa u cirkulaciji – NTBI (Slika 9 A). Gvožđe preuzimaju LSECs. Povećanje koncentracije gvožđa u LSECs dovodi do povećanja ekspresije BMP6 i, u manjoj meri, BMP2 (11). Jedan od mehanizama pomoću kojeg gvožđe indukuje BMP6 u endotelnim ćelijama jetre je transkripcionom regulacijom posredovanom NRF2, koji se aktivira reaktivnim vrstama kiseonika stvorenih pod uticajem gvožđa (126). Aktivacija NRF2 u ovom kontekstu ima

dvostruku korist: indukciju drugih antioksidantnih zaštitnih puteva i ograničavanje daljeg opterećenja gvožđa ushodnom regulacijom hepcidina posredovanom BMP6 (127). Povećanje ekspresije dva najznačajnija BMPs, BMP2 i BMP6, dovodi do ushodne regulacije ekspresije *HAMP* gena (11).

Povećanje koncentracije gvožđa u plazmi takođe direktno detektuju hepatociti, gde se transferin zasićen gvoždem vezuje za TFR1 i TFR2 na membrani hepatocita, favorizujući odvajanje HFE od TFR1 i interakciju između HFE i TFR2 (11). I HFE i TFR2 stimulišu ekspresiju hepcidina kroz funkcionalnu interakciju sa SMAD putem, verovatno formiranjem kompleksa sa HJV i stabilizacijom BMP receptora tip I ALK3 (11, 117) (Slika 9 A). Stabilnost iRNK TFR1 se smanjuje ulaskom gvožđa u ćeliju posredstvom sistema IRP/IRE (13). Sa druge strane, TFR2 je stabilizovan pomoću transferina (128), koji ga preusmerava sa degradacije na put recikliranja (129). Transferin takođe snižava stepen oslobađanja TFR2 sa površine membrane (130).

U uslovima nedostatka gvožđa (Slika 9 B), u LSECs je smanjena sinteza liganda BMP2 i BMP6 (11). HFE se vezuje za TFR1, čiji se nivo ekspresije povećava, dok se nivoi TFR2 snižavaju. Nedostatak gvožđa takođe povećava ekspresiju matriptaze-2 i furina, koji odvajaju membranski HJV, tj. stvaraju solubilni HJV (sHJV) (75, 131). Supresija ekspresije BMP, odvajanje HJV od membrane, sekvestracija HFE sa TFR1 i smanjena ekspresija TFR2 zajedno inhibiraju signalizaciju BMP-SMAD puta, čime se suprimira ekspresija hepcidina (11, 73) (Slika 9 B). Takođe se smatra da histon deacetilaza 3 (HDAC3) ima ulogu u suprimiranju lokusa hepcidina (79). U uslovima deficita gvožđa, redukcija sinteze hepcidina predstavlja adaptivni mehanizam koji pospešuje apsorpciju gvožđa (11, 132-134).

Akutno povećanje koncentracije gvožđa u plazmi u odsustvu opterećenja gvožđa u jetri takođe dovodi do povećanja ekspresije hepcidina, ali bez indukovanja ekspresije jetrene iRNK gena *BMP6* (125). Pomenuti proces je povezan sa indukcijom nishodne signalne kaskade SMAD1/5 (125). Da li se SMAD1/5 aktivacija u ovom kontekstu dešava nishodno od BMP6 ili kao odgovor na BMP2 ili druge BMP ligande još uvek nije razjašnjeno.

1.5.6. Regulacija ekspresije hepcidina inflamacijom, eritropoetskom aktivnošću i drugim stimulusima

Prethodna istraživanja ukazuju da inflamacija ushodno reguliše koncentraciju hepcidina pretežno interleukinom-6 (72) koji indukuje fosforilaciju JAK/STAT3 signalnog puta (11, 135)

(Slika 9 D). Interleukin-6 se vezuje za α -subjedinicu receptora na površini hepatocita, što indukuje dimerizaciju β subjedinica i vodi njihovoj fosforilaciji janus kinazom (JAK). Posledica pomenutog procesa je aktivacija STAT signalnog puta (*eng. Signal Transducer and Activator of Transcription*), pri čemu proteini STAT3 interaguju sa β subjedinicom, dolazi do njihove fosforilacije i translociranja u jedro, gde iniciraju ekspresiju hepcidina (11, 135). Drugi inflamatorni citokini, poput interleukina-1 β i aktivina B, takođe mogu doprineti ekspresiji hepcidina (136), mada su njihove funkcionalne uloge *in vivo* još uvek nepotpuno definisane (96).

Aktivirana eritropoeza usled hipoksije, anemije ili neefektivna eritropoeza indukuju sintezu eritropoetina od strane bubrega (10, 13). Nedavne *in vivo* studije su ukazale da u uslovima hipoksije važnu ulogu u sintezi eritropoetina imaju različite subpopulacije PDGFR- β^+ intersticijalnih ćelija bubrežnog korteksa i spoljašnje medule (137). Sintetisan eritropetin ne samo da povećava stepen proliferacije i terminalne diferencijacije eritrocita, već i indukuje eritroblaste da luče eritroferon (*eng. Erythroferrone, ERFE*) i verovatno druge „eritroidne regulatore“ koji funkcionišu kao supresori transkripcije hepcidina (10, 13, 78). Ovaj proces obezbeđuje adekvatnu dostupnost gvožđa za eritropoezu, ali i doprinosi patološkom opterećenju gvožđa u uslovima neefektivne eritropoeze, npr. kod β -talasemije. Ključna uloga ERFE je demonstrirana nemogućnošću miševa sa gubitkom funkcije *ERFE* gena da suprimiraju sintezu hepcidina u odgovoru na krvarenje ili primenu eritropoetina (11, 138). Nedavno publikovana studija je pokazala da ERFE suprimira ekspresiju hepcidina sekvestracijom BMP2/6 heterodimera od BMP tip I receptora ALK3 (80). Drugi predložen eritroidni regulator je trombocitni faktor rasta BB (*eng. Platelet-Derived Growth Factor-BB, PDGF-BB*). PDGF-BB je indukovano hipoksijom kod ljudi i miševa i dovodi do suprimiranja ekspresije hepcidina (139). Ekspresija faktora rasta i diferencijacije 15 (*eng. Transforming Growth Factor, TGF15*) indukovana je kod pacijenata sa talasemijom (140), ali je njegoa funkcionalna uloga u suprimiranju ekspresije hepcidina manje izvesna (13).

Regulacija translacije hepcidina eritropoetskom aktivnošću i inflamacijom zavisi od funkcionalnog SMAD signalnog puta, što ukazuje na važnu unakrsnu komunikaciju sa putem detekcije koncentracije gvožđa (Slika 9 C) (11, 74). Eritropoetin najverovatnije, barem delimično, potiskuje SMAD signalni put povećanjem potrošnje gvožđa u eritropoezi, smanjenjem koncentracije transferina u cirkulaciji i pokretanjem jetrenog puta detekcije gvožđa (141). Rezultati dobijeni na životinjskom modelu su pokazali da efekti eritropetina ne zahtevaju BMP6 ili HJV (11, 142) i da je *in vivo* aktivnost ERFE oslabljena kada je SMAD signalizacija veoma izražena (142).

Pored inflamacije i aktivne eritropoeze, pokazano je da niz drugih stimulusa reguliše sintezu hepcidina, uključujući hormone (testosteron, estrogen i progesteron), faktore rasta (faktor rasta hepatocita i epidermalni faktor rasta) i druge signalne puteve (Ras/RAF i mTOR) (11, 143). Mnogi od ovih medijatora takođe ispoljavaju ukrštenu komunikaciju sa centralnim BMP-SMAD putem (11, 144).

1.5.7. Komunikacija između sistemske i ćelijske homeostaze gvožđa

Detektovanje koncentracije gvožđa na ćelijskom nivou u nehepatičnim tkivima uključenim u procese eritropoeze i transport gvožđa mogu uticati na sistemsku homeostazu gvožđa. Ključni mehanizam ćelijske homeostaze gvožđa je sistem IRP/IRE (10, 13). IRP su citoplazmatski regulatorni proteini koji detektuju ćelijske zalihe gvožđa i učestvuju u koordinaciji sinteze proteina zaduženih za: ulazak gvožđa u ćeliju (DMT1 i TFR), izlazak gvožđa iz ćelije (feroportin) i skladištenje gvožđa (ferritin) (10, 11, 13).

U uslovima nedostatka gvožđa, aktivnost IRP se povećava, dolazi do: vezivanja za IRE na 3' kraju TFR1 i DMT1, stabilizacije iRNK i povećanja sinteze TFR1 i DMT1; ili vezivanja za IRE na 5' kraju iRNK feritina ili feroportina što rezultuje inhibicijom translacije (10, 11, 13). Pomenutim procesom IRP/IRE sistem dovodi do stimulacije ulaska gvožđa u ćeliju i istovremene inhibicije deponovanja i efluksa gvožđa. IRP se inaktiviraju u uslovima adekvatne količine gvožđa vezivanjem za klaster gvožđa i sumpora ili proteozomalnom razgradnjom pomoću hemerythrin-a i E3-ubikvitin ligaze (*eng. E3-ubiquitin ligase F-box/leucine-rich repeat protein 5*) (10, 11, 13).

Važan senzor ćelijskog statusa gvožđa je i Hipoksijom indukovani faktor (*eng. Hypoxia-inducible factor*, HIF). HIF je član familije transkripcionih faktora koji su stabilizovani nedostatkom gvožđa i/ili hipoksijom (132, 145, 146). Po strukturi je heterodimer

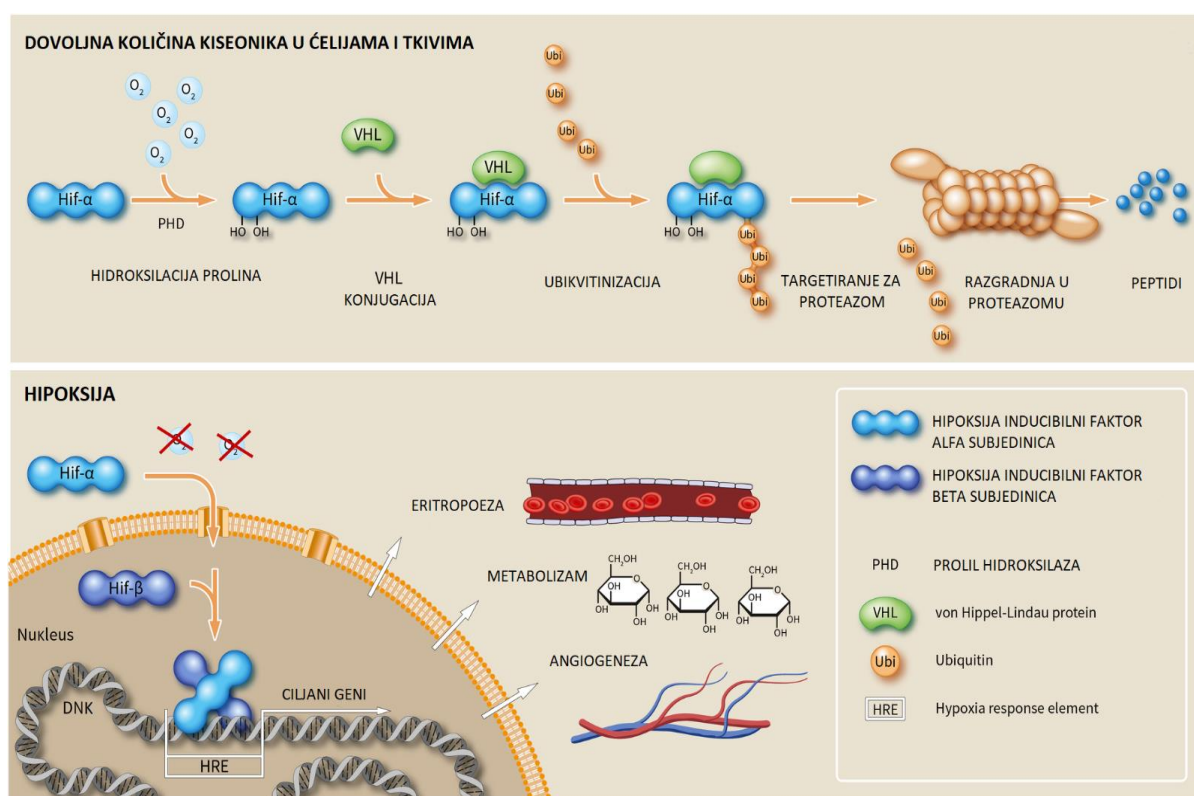
sačinjen od HIF- α i HIF- β (poznata i kao ARNT, *eng. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) subjedinice. Pored HIF-1 α , otkriveni su i strukturno slični HIF-2 α i HIF-3 α čija se ekspresija takođe povećava u hipoksiji i koji stvaraju dimerni oblik sa HIF- β (73, 146). Ekspresija HIF-1 α i HIF-2 α se razlikuje prema tipovima ćelija bubrega. HIF-1 α je uglavnom lociran u epitelnim ćelijama tubula, dok je HIF-2 α najčešće prisutan u endotelnim ćelijama i fibroblastima (147). Podaci ukazuju da je HIF-2 prevashodno zadužen za regulaciju transkripcije feroportina, DMT1, Dcytb i eritropoetina, a HIF-1 za regulaciju transferinskih receptora, ceruloplazmina, hemoksigenaze-1 i hepcidina (73, 148).

Aktivnost HIF je više određena stabilnošću proteina HIF- α nego transkripcijom i translacijom (10, 11, 73, 149). Dakle, u uslovima hipoksije dolazi do stabilizacije i nagomilavanja HIF- α i njegove migracije u nukleus. Zatim dolazi do stvaranja dimera sa HIF- β i vezivanja za hipoksija promotorni element (*eng. Hypoxia responsible element, HRE*) (Slika 11) (149). Osim što je HIF prepoznat kao transkripcioni faktor čija se funkcija ogleda u aktivaciji ekspresije gena koji kodira eritropoetin (150), on je takođe odgovoran za indukciju više gena koji pored metabolizma gvožđa i eritropoeze, učestvuju u procesima angiogeneze, glikolize, preživljavanja ćelija, apoptoze, što zajedno predstavlja ćelijsku mrežu odgovora na hipoksičnu sredinu (Slika 11) (134, 151).

U uslovima adekvatne količine kiseonika HIF- α je inaktiviran protil hidrosilazama (*eng. prolyl hydroxylases, PHD*) (Slika 11) (152, 153). Grupa PHD enzima (PHD1, PHD2 i PHD3) katalizuju hidrosilaciju protil rezidua HIF-1 α i HIF-2 α u uslovima koji pored dovoljne količine kiseonika podrazumevaju i kofaktore: gvožđe i α -ketoglutarat (152, 153). Ovaj proces obezbeđuje motive za prepoznavanje od strane von Hippel-Lindau tumor supresornog proteina koji je komponenta kompleksa E3 ubikvitin ligaze. Nakon obeležavanja von Hippel-Lindau proteinom, HIF se usmerava na razradnju u proteazomu (152, 153). Činjenica da je kiseonik neophodan za odvijanje procesa hidrosilacije i degradacije HIF čini da mehanizam PHD-HIF funkcioniše kao delikatan molekularni senzor hipoksije (151).

Rezultati *in vivo* ispitivanja su pokazali da HIF-1 α i HIF-2 α ne utiču direktno na ekspresiju *HAMP* gena, odnosno sintezu hepcidina (154). Samatra se da HIF-2 α deluje indirektno aktiviranjem transkripcije eritropoetina (138, 155). Suprimiranje ekspresije *HAMP* gena u ovom slučaju zahteva efikasnu eritropoezu, tj. adekvatan odgovor koštane srži na delovanje eritropoetina i sintezu hormona eritroferona (138).

Najbolji primer gde koncentracija gvožđa u ćeliji može uticati na sistemsku homeostazu gvožđa su enterociti. Naime, u navedenim ćelijama HIF-2 α posreduje u ushodnoj regulaciji DMT1, Dctyb i feroportina kao odgovor na nedostatak gvožđa, a u cilju povećanja apsorpcije gvožđa (156, 157). Schwartz i sar. su pokazali da je duodenalni HIF-2 α pod kontrolom hepcidina, ukazujući da ovaj transkripcioni faktor nije regulisan samo kiseonikom već i gvoždem (132). Genetski poremećaj intestinalne HIF-2 α signalizacije dovodi do smanjenja nivoa gvožđa u serumu i tkivima, pogoršanja deficita gvožđa i anemije zbog deficita gvožđa uprkos odgovarajućem suprimiranju sinteze hepcidina (156). Najverovatnije je da IRP ima više kontraregulatornog efekta u ovom sistemu nishodnom regulacijom HIF-2 α (158).



Slika 11. Ćelijska detekcija dostupne količine kiseonika i adaptacija na hipoksiju. Preuzeto i prilagođeno od (134, 159)

1.6. Kinetika hepcidina

Xiao i sar. (160) su odredili brzinu produkcije hepcidina kod makaki majmuna od 7,6 nmol/kg/h (20,5 μ g/kg/h) (160). Korišćenjem konverzionog faktora*, izvedenog na osnovu razlika u površini tela, (20,5 μ g/kg/h \times 75 kg \times 24h \times 12/37*) procenjeno je da čovek telesne mase od 75 kg u fiziološkim uslovima produkuje oko 12 mg hepcidina na 24h (161). Poluvreme eliminacije hepcidina je relativno kratko i iznosi nekoliko minuta (160).

Smatra se da značajan deo hepcidina u fiziološkim uslovima cirkuliše slobodan, dok se određeni deo nalazi vezan za α_2 -makroglobulin i albumin (162). Nedavna ispitivanja Diepeveen i sar. (163) na grupi hroničnih bubrežnih bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom su pokazala da frakcija hepcidina vezanog za proteine iznosi 40% (\pm 23%), odnosno značajni udeo hepcidina cirkuliše slobodan omogućavajući direktnu i brzu bioaktivnost hormona (163). Prethodne studije su nedvosmisleno pokazale da je glavni put eliminacije hepcidina ekskrecija putem bubrega (39, 164). Molekulska masa hepcidina-25 od samo 2789,4 g/mol (Da) i dokazi da se samo < 3% filtriranog hepcidina izlučuje urinom (164), zajedno ukazuju da se hepcidin, kao peptidni hormoni slične molekulske mase, lako filtrira u glomerulima a reapsorbuje i razgrađuje u ćelijama proksimalnih tubula bubrega (164). Imajući u vidu mehanizam dejstva hepcidina, može se zaključiti da se određena količina hepcidina eliminiše iz organizma razgradnjom kompleksa hepcidin-feroportin. Koliki je udeo hepcidina koji se razgrađuje u ciljnim tkivima, odnosno eliminiše putem bubrega još uvek nije potpuno razjašnjeno (45).

Studije spovedene na miševima su pokazale da je efekat hepcidina na sniženje nivoa serumskog gvožđa zavisao od koncentracije hepcidina i da se dešava u okviru 4h, a zadržava duže od 48h (29). Indirektna indukcija sinteze hepcidina od strane IL-6 ili lipopolisaharida (LPS) dovela je takođe do brze eliminacije hepcidina urinom kod ljudi (72, 165). Dakle, hepcidin je delovao kao protein akutne faze sa maksimalnom vrednošću nakon 6 sati, koja je praćena postojanim smanjenjem. Administracija oralnih preparata gvožđa (65 mg gvožđa u obliku gvožđe sulfata) zdravim dobrovoljcima tokom tri dana dovela je do značajnog povećanja (približno pet puta) koncentracije hepcidina u urinu nakon 24h od prve doze, koje je nestajalo tokom narednih dana uprkos daljem unosu gvožđa (72). Maksimalni nivo hepcidina u urinu sugerise brzo uklanjanje hepcidina iz cirkulacije, sa održivim inhibitornim efektom na unos gvožđa, što su pokazali nepromenjeni parametri gvožđa tokom narednih dana (72).

1.7. Hronična bubrežna slabost

Hronična bubrežna slabost (HBS) predstavlja zdravstveni problem koji se javlja širom sveta i povezana je sa visokim kardiovaskularnim komorbiditetom, smanjenim kvalitetom života i većom stopom smrtnosti. Većinu bolesti bubrega karakteriše asptomatski tok i ukoliko je neprepoznata i nelečena vodi terminalnom stadijumu bubrežne slabosti (*eng. End Stage Renal Disease, ESRD*). Tokom prethodne dve decenije incidenca terminalne bubrežne slabosti

je eksponencijalno rasla prevashodno zbog porasta broja bolesnika čija je bubrežna slabost nastala usled dijabetesa, hipertenzije, kao i porasta broja starih u ESRD (166-169). Trenutno se u svetu leči preko dva miliona bolesnika nekom od tri metode za zamenu funkcije bubrega (hemodijaliza (HD), peritoneumska dijaliza, transplantacija bubrega) (166-170).

1.7.1. Definicija i klasifikacija HBS

Nacionalna fondacija za bubrež (eng. *National Kidney Foundation*, NKF) Sjedinjenih Amaričkih Država (SAD) u KDOQI (eng. *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) vodiču je definisala HBS kao oštećenje strukture ili funkcije bubrega koje traje više od tri meseca i/ili smanjenje jačine glomerularne filtracije ispod 60 mL/min/1,73 m² (171). Oštećenje strukture ili funkcije bubrega, koje je navedeno u definiciji, podrazumeva ili prisustvo patološkog nalaza analize urina (mikroalbuminurija, proteinurija, eritrociturija, leukociturija, cilindurija), ili nenormalnosti otkrivene metodama vizualizacije (ultrazvuk, kompjuterizovana tomografija i drugo) ili patohistološkim pregledom (171). Na osnovu oštećenja bubrega i vrednosti procenjene brzine glomerularne filtracije (eng. *estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR), procenjuje se težina HBS i izražava kao jedan od 5 stadijuma. U Tabeli 2 su navedeni opisi i eGFR koje odgovaraju klasifikaciji HBS predloženoj od strane NKF SAD, a koja je kasnije prihvaćena širom sveta (171).

Tabela 2. Klasifikacija hronične bolesti bubrega

Stadijum	Opis	eGFR (mL/min/1,73 m ²)
1.	Oštećenje bubrega sa normalnom ili povećanom eGFR	> 90
2.	Oštećenje bubrega sa blagim smanjenjem eGFR	60 – 89
3. A	Oštećenje bubrega sa umerenim smanjenjem eGFR	45 – 59
3. B		30 – 44
4.	Teško smanjenje eGFR	15 – 29
5.	Terminalna bolest bubrega	< 15 (ili dijaliza)

eGFR – procenjena brzina glomerularne filtracije

Stadijum 5 HBS predstavlja ESRD koja je definisana eGFR manjom od 15 mL/min/1,73 m² ili je usled težine simptoma nephodno primeniti lečenje nekom od metoda zamene bubrežne funkcije (hemodijaliza, peritoneumska dijaliza, transplantacija) (171).

Premda su uzroci hroničnog oštećenja bubrega brojni, smatra se da 70% bolesnika ima prethodno dijagnostikovan dijabetes ili hipertenziju (169).

1.7.2. Faktori rizika za nastanak HBS

Dosadašnja saznanja sažeta u vodičima za HBS označavaju sledeće populacije koje su izložene povećanom riziku za razvoj bolesti: bolesnici sa dijabetesom, hipertenzijom, osobe sa pozitivnom porodičnom anamnezom i starije osobe (iznad 60 godina) (171-173). Iako postoji opšta saglasnost da bolesnici sa hipertenzijom i dijabetesom čine najveći broj bolesnika sa visokim rizikom od HBS, različiti vodiči su predložili i druge grupe sa povećanim rizikom za razvoj HBS (Tabela 3) (169, 171-173).

Tabela 3. Populacije sa povećanim rizikom za razvoj HBS

Dijabetes
Hipertenzija
Osobe starije od 60 godina
Multisistemske bolesti
Korišćenje nefrotoksičnih lekova
Pozitivna porodična anamneza o bubrežnim bolestima
Postojanje rizika za opstruktivnu nefropatiju
Kardiovaskularne bolesti (srčana insuficijencija, ishemijska bolest srca)

Preuzeto i prilagođeno od (169)

Vodič KDOQI takođe daje klasifikaciju faktora rizika u odnosu na mogućnost i stepen smanjenja rizika primenom određenih intervencija. Prema ovoj podeli faktori rizika se mogu razvrstati u tri grupe (Tabela 4): faktori koji povećavaju osetljivost za HBS, faktori koji pokreću HBS i faktori koji ubrzavaju progresiju HBS (171).

Tabela 4. Klasifikacija i definicija faktora rizika za HBS

Faktori	Definicija	Primeri
Povećane osetljivosti	Povećavaju osetljivost bubrega na oštećenje	Pozitivna porodična anamneza, starost, siromaštvo, smanjena masa bubrega, mala težina na rođenju, pripadnost određenim etničkim grupama
Pokretanja	Direktno započinju oštećenje bubrega	Hipertenzija, dijabetes, sistemske infekcije, autoimunske bolesti, infekcija i opstrukcija mokraćnih puteva, nefrolitijaza, neoplazme, toksični lekovi, kardiovaskularna oboljenja
Progresije	Uzrokuju pogoršanje oštećenja bubrega i ubrzavaju smanjenje funkcije bubrega nakon početnog oštećenja	Obilnija proteinurija, neregulisana hipertenzija, neregulisana glikemija, gojaznost, pušenje

Preuzeto i prilagođeno od (169, 171)

Prema rezultatima nedavnih istraživanja pokazano je da je HBS zastupljena kod 14,0% ukupne populacije SAD. Prevalenca anemije u opštoj populaciji SAD je 7,6%, dok je kod bolesnika sa HBS približno dva puta veća 15,4% (~4,8 miliona) (174). Epidemiološka studija sprovedena na populaciji republike Srbije je pokazala prevalencu ESRD kod odraslih od 0,07% (175). Hemodijaliza je okarakterisana kao najzastupljeniji metod lečenja bolesnika u ESRD (74,3%) kod nas (175).

1.8. Anemija u HBS: karakteristike, patofiziologija i evaluacija

Iako je u literaturi prisutan termin „metabolizam“ gvožđa, samo gvožđe se ne metaboliše u klasičnom smislu. Shodno tome, poremećaji homeostaze gvožđa kod ljudi su uvek poremećaji balansa ili distribucije gvožđa. Anemija zbog nedostatka gvožđa (sideropenijska anemija), hemohromatoza i anemija u sklopu hronične bolesti su uobičajeni primeri ovog principa (1). Anemija hronične bolesti i sideropenijska anemija su danas najzastupljenije anemije širom sveta, koje se često javljaju udruženo u populaciji zemalja u razvoju kod kojih

je izražena visoka prevalenca infekcija i nutricionog deficita (10, 68, 133, 167). Tradicionalna definicija sideropenijsku anemiju karakteriše kao “mikrocitnu, hipohromnu anemiju nastalu usled nedostatka gvožđa u organizmu” (176).

Anemija, koja je gotovo neodvojiva u hroničnoj bubrežnoj slabosti, ubraja se u anemiju hronične bolesti. U nastanku anemije hronične bolesti učestvuju proinflamatorni citokini, pa se naziva i "anemija u inflamaciji" jer se javlja u okviru hroničnih infekcija, inflamacije ili malignih bolesti (10, 68, 133, 177-179). U patofiziologiji anemije u HBS, pored inflamacije, dodatno su uključena dva mehanizma: smanjena sinteza eritropoetina zbog bubrežne slabosti i antiproliferativni efekat nagomilanih uremijskih toksina (10, 68, 133, 177, 178). Anemija u HBS je obično blaga do umereno jaka (hemoglobin retko niži od 80 g/L) (10, 68, 133, 177-179). Incidenca anemije raste sa progresijom bubrežne bolesti i smanjenjem eGFR, tako da zahvata više od 70% bolesnika u ESRD (10, 171, 172).

Poremećaj u homeostazi gvožđa predstavlja osnovnu odliku anemije u HBS, pri čemu nedostatak gvožđa može biti apsolutni ili funkcionalni (10, 68, 133, 179-181). Pored smanjenog životnog veka eritrocita u HBS, bolesnici u ESRD imaju i povećan gubitak gvožđa iz organizma (182, 183). Procenjeno je da bolesnici u ESRD, koji nisu na HD, imaju prosečan dnevni gubitak krvi u gastrointestinalnom sistemu od 3,15 mL, dok je ovaj gubitak viši kod HD bolesnika i iznosi 6,27 mL (184, 185). Koristeći ove vrednosti, može se proceniti gubitak krvi od 1 – 2 L na godišnjem nivou koji je isključivo posledica gubitka iz gastrointestinalnog sistema kod pacijenata na HD. Zatim, bolesnici na HD tretmanu gube gvožđe zbog same HD procedure i usled česte venepunkcije. Procenjena ukupna zapremina izgubljene krvi se kreće u rasponu od 2 – 5 L/godinu dana kod bolesnika koji su dugo vremena na terapiji HD (185, 186). Pri koncentraciji hemoglobina u okviru referentnog opsega, 1 mL krvi sadrži 0,5 mg gvožđa. Pod pretpostavkom da je koncentracija hemoglobina 20% niža kod pacijenata u ESRD, ukupan gubitak krvi od 2 – 5 L godišnje odgovara gubitku gvožđa od 0,8 – 2,0 g (187). Prosečan godišnji gubitak gvožđa od 2 – 3 g za pacijente koji su podvrgnuti hroničnoj HD (uključujući i fiziološki gubitak) su predložili i drugi autori (188, 189). Pored povećanih gubitaka gvožđa, bolesnici u ESRD su izloženi povećanom riziku za smanjeni unos i apsorpciju gvožđa. Smanjen unos proteina usled smanjenog apetita i pridržavanja niskoproteinskoj dijeti može dovesti do smanjenja količine gvožđa dostupnog za apsorpciju (185). Istovremena upotreba određenih lekova, kao što su inhibitori protonske pumpe, mogu inhibirati apsorpciju gvožđa u enterocitima i dodatno doprineti nedostatku gvožđa (190). Kao posledica povećanih gubitaka i smanjene apsorpcije gvožđa većina nelečenih bolesnika u ESRD ima ispražnjene depoe

gvožđa, koji ako se ne popune transfuzijom ili suplementacijom gvožđa progrediraju do stanja apsolutnog nedostatka gvožđa (191). Apsolutni nedostatak gvožđa se javlja kada su telesne rezerve gvožđa niske, što je praćeno niskim koncentracijama feritina i sniženim procentom saturacije transferina u krvi. U anemiji u ESRD češći je funkcionalni nedostatak gvožđa, kada je povećano preuzimanje gvožđa iz cirkulacije i njegovo deponovanje u ćelijama retikuloendotelnog sistema, ali je dostupna količina gvožđa mala i ne može da zadovolji potrebe eritropoeze, jer je gvožđe "zarobljeno" u jetri. Bolesnici sa funkcionalnim nedostatkom gvožđa imaju obično normalne ili visoke koncentracije feritina, dok je procenat saturacije transferina najčešće normalan (179, 192-194). Dodatno, klinička slika može biti komplikovana preklapanjem apsolutnog i funkcionalnog deficita gvožđa. Zbog različitog terapijskog pristupa u lečenju anemije kod pacijenata u ESRD, izuzetno je važno identifikovati uzrok anemije, odnosno odrediti da li je nedostatak gvožđa apsolutni ili funkcionalni (192).

Postojeća terminologija u vezi sa statusom gvožđa bolesnika u HBS je nedosledna. Naime, Controversies Conference KDIGO (185) je definisala prekomerno opterećenje gvožđem na osnovu potencijalnih ili manifestnih neželjenih posledica i konotira potencijalno štetno ili nepovoljno stanje. U svetlu navedenih činjenica, Wish i sar. (187) predlažu usmeravanje fokusa na „balans gvožđa“ u cilju opisivanja promena ukupnog sadržaja telesnog gvožđa, bez obzira na posledice (187). Na osnovu nemogućnosti tačnog merenja unosa i gubitka gvožđa, precizna kvantifikacija ravnoteže gvožđa je trenutno nemoguća, ali upotreba ovog termina naglašava potrebu razmatranja terapijske primene gvožđa u kontekstu gubitaka gvožđa i međusobnog neto balansa. „Negativan balans gvožđa“ opisuje stanje u kome se sadržaj gvožđa u telu smanjuje usled relativnog smanjenja unosa i/ili povećanja gubitka gvožđa. Vremenom, negativan balans gvožđa može progredirati do funkcionalnog i apsolutnog nedostatka gvožđa i anemija. Kao što je navedeno u tekstu iznad, HD bolesnici (bez suplementacije gvožđa) su izloženi posebno visokom riziku za razvoj negativnog balansa gvožđa, što dovodi do pražnjenja depoa i smanjene biorasploživosti gvožđa (185, 195, 196).

Stanja u kojima se povećava sadržaj telesnog gvožđa predstavlja „pozitivni balans gvožđa.“ Takvo stanje može biti posledica povećanja unosa i/ili smanjenja gubitka gvožđa. Za bolesnike na hroničnom tretmanu HD, gubici gvožđa su obično stabilni tokom vremena. Dakle, pozitivan balans gvožđa među HD pacijentima je generalno rezultat povećanog unosa gvožđa zbog terapije *i.v.* gvožđem. S obzirom na procenjene gubitke gvožđa kod pacijenata na terapiji HD, *i.v.* terapija gvožđa koja prelazi 2 – 3 g godišnje verovatno će rezultirati pozitivnim

balansom gvožđa. Wish i sar. (187) smatraju da termin „pozitivni balans gvožđa“ preciznije opisuje stanje homeostaze gvožđa od „preopterećenja gvožđem“ (187).

Anemija kod bolesnika u ESRD je hipoproliferativna, normocitna normohromna, premda evaluacija i definitivna dijagnoza može biti otežana postojanjem gubitka gvožđa, delovanjem lekova kao i postojanjem talasemije (183, 193). Zato procena i klasifikacija anemije mora najpre da obuhvati određivanje kompletne krvne slike (sa apsolutnim brojem i indeksima retikulocita) i statusa gvožđa (serumsko gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa – TIBC, saturacija transferina – TSAT, feritin). Anemija hronične bolesti praćena je umerenim smanjenjem koncentracije hemoglobina sa niskim ili nisko normalnim serumskim gvožđem i sniženim ukupnim kapacitetom vezivanja gvožđa, normalnom saturacijom transferina i normalnim ili povišenim koncentracijama feritina (179, 183, 192, 193). Iako se prema preporukama aktuelnih vodiča procena statusa gvožđa, odnosno utvrđivanje deficita gvožđa u anemiji HBS najčešće zasniva na određivanju biohemijskih parametara feritina i TSAT, treba imati u vidu njihova ograničenja (184). Naime, u stanju bez inflamacije feritin je pouzdan biomarker za procenu stanja deponovanog, a TSAT za procenu funkcionalnog gvožđa. Međutim, u stanjima hronične i akutne inflamacije feritin ima ulogu pozitivnog reaktanta akutne faze, tj. njegova koncentracija se povećava nezavisno od količine deponovanog gvožđa, što može zamaskirati postojanje deficita gvožđa. Sa druge strane, zbog inhibitornog uticaja TNF- β transferin se „troši“ na mestima inflamacije, tj. ima ulogu negativnog reaktanta akutne faze, a što posledično dovodi do sniženog TIBC i utiče na povećanje TSAT (10, 184). Zato je za potvrdu nedostatka gvožđa u anemiji hronične bolesti neophodno koristiti specifičnije testove kao što su koncentracija solubilnih transferinskih receptora (sTfR) i feritinski indeks (odnos sTfR/log feritin) (194, 197, 198). sTfR je marker čija koncentracija daje informacije o stanju funkcionalnog odeljka gvožđa, u direktnoj je korelaciji sa brojem transmembranskih transferinskih receptora, odnosno eritropoetskom aktivnošću jer odražava stepen proliferacije eritroidnih prekurzora, i u indirektnoj je korelaciji sa količinom raspoloživog gvožđa za eritropoezu (10). Za razliku od feritina i TSAT, sTfR nije pod uticajem inflamacije, i može se koristiti u diferencijaciji anemije hronične bolesti (koncentracija sTfR je u okviru referentnih vrednosti) od sideropenijske anemije (značajno povišena koncentracija sTfR) (10). Korišćenjem indeksa sTfR/log feritin povećava se dijagnostička osetljivost za razlikovanje anemije hronične bolesti od anemije usled nedostatka gvožđa, sa dokumentovanom tačnošću od 92% (198). I pored brojnih prednosti, nedostatak standardizacije određivanja sTfR je ograničio široku primenu ovog markera u rutinskoj kliničkoj praksi (199).

Retikulociti predstavljaju nezrele eritrocite, odnosno prelaznu formu ćelija između eritroblasta i zrelih eritrocita (10). Sinteza retikulocita u koštanoj srži traje 2 – 3 dana, nakon koje se oslobađaju u cirkulaciju i nakon 1 – 2 dana diferenciraju u zrele eritrocite. Stoga se smatra da koncentracija i karakteristike retikulocita u perifernoj krvi obezbeđuju objektivan odraz nedavne eritropoetske aktivnosti (173, 200-202). Prethodne studije su pokazale da sadržaj hemoglobina u retikulocitu predstavlja pouzdan parametar koji daje informacije u realnom vremenu (48 sati) o nedavnoj funkcionalnoj raspoloživosti gvožđa za eritroidne prekuzore, odnosno omogućuje direktnu procenu inkorporacije gvožđa u hemoglobin; a udeo hipohromnih eritrocita odražava status gvožđa u poslednjih 90 – 120 dana i predstavlja marker eritropoeze sa ograničenom količinom gvožđa (171, 173, 200, 201, 203-206).

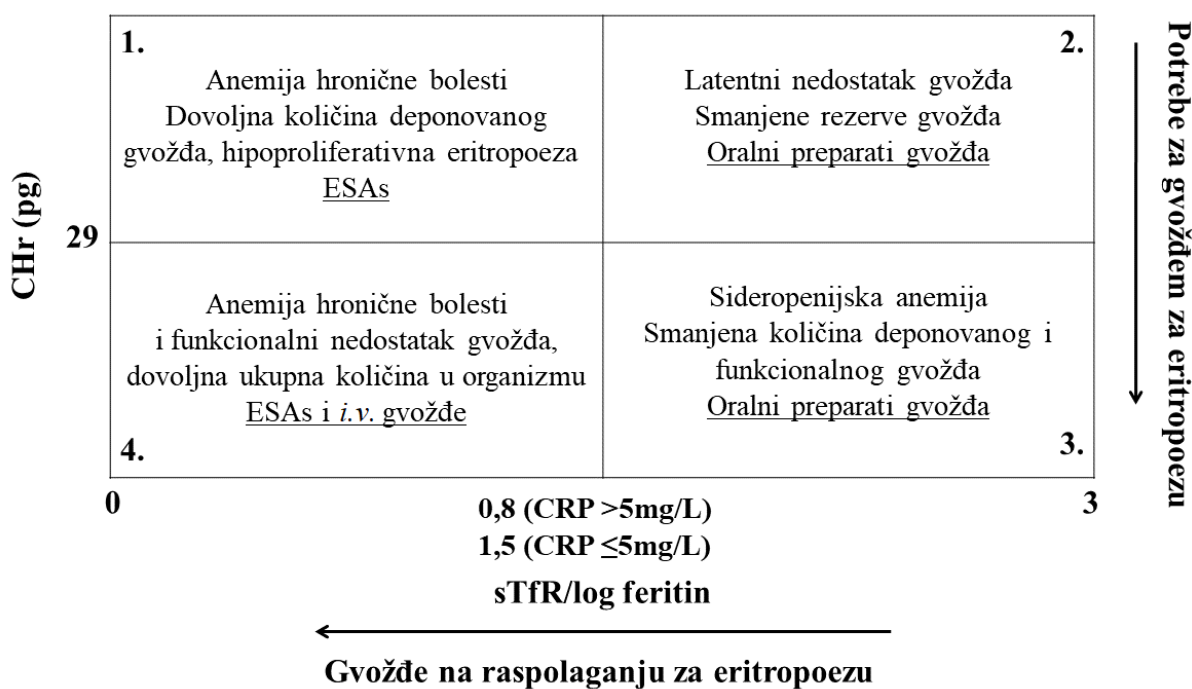
Princip određivanja i vrsta novih hematoloških parametara zavise od tehnologije koja je primenjena na hematološkim analizatorima. Danas se udeo hipohromnih eritrocita i sadržaj hemoglobina u retikulocitima može odrediti na nekoliko hematoloških analizatora različitih proizvođača: %HYPO (*eng. % of the Hypochromic erythrocytes*; koncentracija hemoglobina u eritrocitima < 280 g/L) i CHr (*eng. Reticulocyte cellular hemoglobin content*) (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka); HYPO-He (*eng. HYPO Equivalent*) i Ret-HE (*eng. Reticulocyte Hemoglobin Equivalent*) (Sysmex Corporation, Kobe, Japan); i LHD% (*eng. Low Hemoglobin Density*) i RSf (*eng. Red Blood Cell Size factor*) (Beckman Coulter, Inc., SAD). Flow/protočna citometrija je omogućila direktan uvid u karakteristike pojedinačnih ćelija. Na platformi proizvođača Siemens, CHr je određen merenjem zapremine i koncentracije hemoglobina svakog retikulocita (194). Za razliku od CHr, metodu za određivanje Ret-HE ne karakteriše direktno određivanje koncentracije hemoglobina u retikulocitu, već se procenjuje ekvivalent hemoglobina na osnovu odnosa intenziteta rasute svetlosti i srednjeg sadržaja hemoglobina u eritrocitu (207). Određivanje sadržaja hemoglobina u retikulocitu na analizatorima proizvođača Beckman Coulter se zasniva na računskoj operaciji u čijoj su osnovi srednja zapremina eritrocita i srednja zapremina retikulocita (208). I pored fundamentalnih razlika u tehnologijama primenjenim na hematološkim analizatorima različitih proizvođača, određene vrednosti sadržaja hemoglobina u retikulocitu i udela hipohromnih eritrocita dobro koreliraju i obezbeđuju istu kliničku informaciju (207, 209, 210).

Novi hematološki parametri se smatraju markerima hemoglobinizacije eritrocita, doprinose napretku ispitivanja anemije sa aspekta pouzdanije detekcije neravnoteže između aktuelne raspoloživosti gvožđa i potreba eritroidnih prekuzora, a koja dovodi do sinteze hipohromnih eritrocita i retikulocita (211). Prednosti navedenih hematoloških parametara su

sledeće: 1. daju značajne informacije na ćelijskom nivou (sadržaj hemoglobina u eritrocitu/retikulocitu, prate promene u inkorporaciji hemoglobina u eritroidne prekurzore, osetljiviji su od direktnih biohemijskih markera), 2. operativno su efikasni (automatizovano određivanje u kratkom vremenskom intervalu, brza informacija o statusu gvožđa, brže daju odgovor na delovanje terapije, finansijski su opravdani). Njihov značaj se ogleda i u činjenici da su pouzdani markeri eritropoeze sa ograničenom količinom gvožđa u kompleksnim kliničkim stanjima, i mogu se koristiti za procenu funkcionalnog deficita gvožđa (200, 203, 205, 206, 208-211).

U stanju inflamacije, novi hematološki indeksi se smatraju zlatnim standardom za procenu količine gvožđa koja je na raspolaganju za potrebe eritropoeze (171, 172, 194, 198, 212). Primenom Thomasovog algoritma mogu se identifikovati nedovoljne količine gvožđa za efikasnu eritropoezu u uslovima inflamacije. U osnovi Thomasovog algoritma je kombinovana primena biohemijskih i hematoloških biomarkera sa najboljom osetljivošću – feritinski indeks (odnos sTfR/log feritin), CHr i %HYPO. Važno je naglasiti da granične vrednosti sTfR/log feritin zavise od proizvođača i inflamatornog statusa. Na osnovu algoritma mogu se odrediti različite faze u nedostatku gvožđa: 1. hipoproliferativna eritropoeza, 2. latentni nedostatak gvožđa, 3. sideropenijska anemija i 4. kombinovano stanje nedostatka gvožđa i hipoproliferativne eritropoeze. Rezultati algoritma ukazuju na adekvatan terapijski pristup. Bolesnici sa 1. hipoproliferativnom eritropozom podležu terapiji agensima stimulacije eritropoeze; dok se 2. latentni nedostatak gvožđa i 3. klasična sideropenijska anemija koriguju oralnim preparatima gvožđa, a 4. kombinovano stanje deficita gvožđa i anemije hronične bolesti leči agensima stimulacije eritropoeze (ESAs) i *i.v.* preparatima gvožđa (Slika 12) (171, 172, 194, 198, 212, 213).

Prilagođen Thomasov dijagnostički dijagram za identifikaciju različitih faza deficita gvožđa i implikacije za terapiju na osnovu rezultata dijagrama predstavljeni su na Slici 12. Granične vrednosti indeksa sTfR/log feritin su usklađene prema proizvođaču reagensa sTfR, a vrednost CHr prema preporukama KDOQI i UKRA vodiča (171, 173, 213).

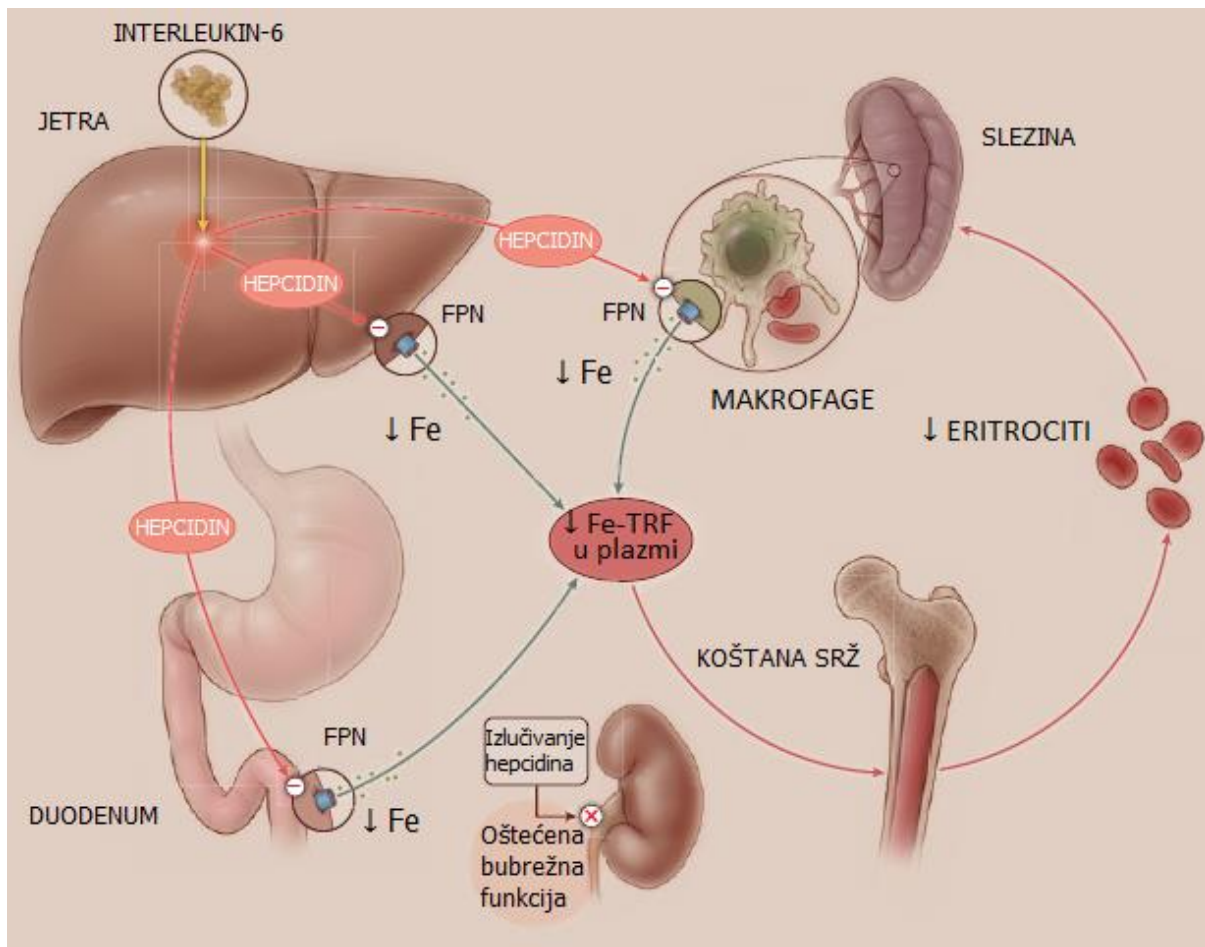


Slika 12. Prilagođen Thomasov dijagnostički dijagram za identifikaciju faza deficita gvožđa i terapijski pristup prema dobijenoj klasifikaciji. Preuzeto i prilagođeno prema (171, 173, 213).

U dosadašnjoj literaturi nema dovoljno podataka o povezanosti između koncentracije hepcidina-25 i eritrocitnih i retikulocitnih indeksa kod anemičnih bolesnika u ESRD, klasifikovanih prema procenjenom statusu balansa gvožđa (apsolutni nedostatak gvožđa, adekvatan status ili pozitivan balans statusa gvožđa). Takođe, gornja granica adekvatnog balansa gvožđa, reflektovana nivoom hepcidina-25, još uvek nije utvrđena.

Delovanje hepcidina-25 se zasniva na blokiranju transporta gvožđa u sistemsku cirkulaciju, pa na ovaj način gvožđe ostaje zarobljeno i nedostupno za eritropoezu (21, 23, 29, 68, 177). Danas se smatra, da je citokinima stimulisana sinteza hepcidina-25 jedan od mehanizama kojim se objašnjava redistribucija gvožđa tokom inflamacije (68, 133, 179) (Slika 13). Literaturni podaci ukazuju na visoku prevalencu inflamacije (30-50%) u HBS (214, 215). Potencijalni uzroci koji doprinose hroničnom inflamatornom statusu u HBS su brojni i mogu se podeliti u dve grupe. Prva grupa faktora je vezana za bubrežnu bolest i uključuje: povećanu produkciju i smanjen klirens inflamatornih citokina, oksidativni stres i acidozu, hronične i rekurentne infekcije u koje spadaju i one povezane sa vaskularnim pristupom, poremećen metabolizam lipida, genetska predispozicija, i izmenjen intestinalni mikrobiotski sistem. Inflamacija pozitivno korelira sa eGFR u ESRD i kulminira kod HD bolesnika, gde dodatni uzrok produkcije citokina može biti druga grupa uzroka koja je u vezi sa dijaliznim tretmanom

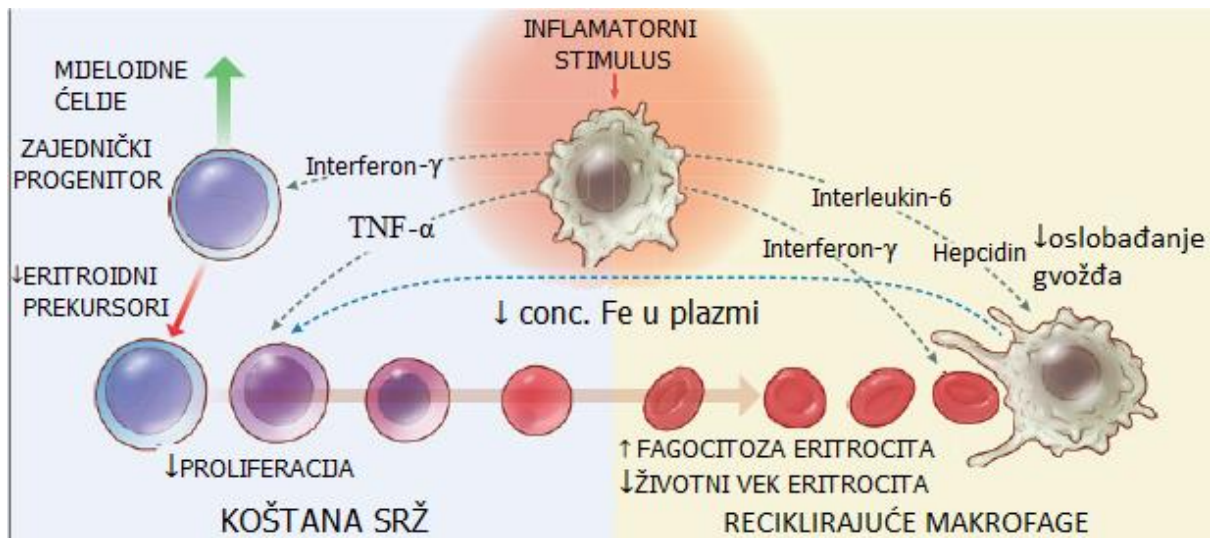
(mikrobiološka kontaminacija dijalizata i bioinkompatibilni faktori u dijaliznom ciklusu) (10, 215).



Slika 13. Promene u homeostazi gvožđa kod anemije u inflamaciji. Preuzeto i prilagođeno od (68)

Dosadašnja saznanja ukazuju da kod bolesnika u ESRD inflamacija dovodi do poremećaja i u ranom periodu eritropoeze, koji je zavisan od eritropoetina, i u kasnom koji zavisi od gvožđa, što je karakteristika anemije u hroničnim bolestima (Slika 14) (13, 68, 133, 216). Pored toga što stimulišu sintezu hepcidina u jetri, proinflamatorni citokini (interleukin-6, TNF- α , interferon- γ i interleukin-1) inhibiraju oslobađanje eritropoetina, dovode do „remodelovanja“ hematopoeze potencirajući produkciju ćelija mijeloidne loze, negativno i direktno utiču na rast ranih eritroblasta i posebno u nedostatku eritropetina uzrokuju smrt nezrelih eritroblasta, aktiviraju makrofage za eritrofagocitozu i na taj način skraćuju životni vek eritrocita i dovode do snižene koncentracije gvožđa u cirkulaciji (10, 68, 217, 218). Odgovor eritroidnih prekurzora na delovanje eritropoetina je takođe izmenjen pod inflamatornim uticajem, i uobičajeno se manifestuje povećanim potrebama za eritropoetinom

kod bolesnika u ESRD (219, 220). Rezultati nedavnih ispitivanja su ukazali da rezistencija na delovanje eritropoetina delom može biti objašnjena smanjenim brojem receptora za eritropoetin na eritroidnim progenitorima koji je posledica efekta snižene koncentracije gvožđa u cirkulaciji, a koji dovodi do smanjenog proliferativnog kapaciteta ovih progenitora (Slika 13 i 14) (216).



Slika 14. Uloga sistemske inflamacije u anemiji. Visoki nivoi citokina u sistemske inflamaciji dovode do „remodelovanja“ hematopoeze potencirajući produkciju ćelija mijeloidne loze (velika zelena strelica) na štetu eritropoeze (crvena strelica) (interferon- γ), inhibiraju proliferaciju eritroidnih prekurzora (TNF- α), aktiviraju makrofage za eritrofagocitozu i na taj način skraćuju životni vek eritrocita (interferon- γ), inhibiraju oslobađanje recikliranog gvožđa iz makrofaga (interleukin-6, tj. hepcidin), dovode do hipoferemije koja inhibira proliferaciju eritroblasta. Isprekidanim linijama su predstavljeni solubilni medijatori koji regulišu eritropoezu. Preuzeto i prilagođeno od (68)

Nekoliko studija je potvrdilo ulogu genetskih faktora u regulaciji metabolizma gvožđa kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, kao što su mutacije C282Y i H63D u genu *HFE* i polimorfizam *TMPRSS6* A736V matriptaze-2 (221-223). Međutim, uticaj polimorfizama *TMPRSS6* A736V i *HFE* (C282Y i H63D) na nivoe hepcidina-25 i parametre statusa gvožđa kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti stratifikovanih prema polu nije prethodno ispitivan. Rezultati ovog ispitivanja bi mogli dati dodatna objašnjenja molekularnih mehanizama povezanih sa poremećajima metabolizma gvožđa kod obolelih u ESRD.

1.9. Terapija anemije u HBS

Definisanje gena odgovornog za translaciju eritropoetina, sinteza agenasa stimulacije eritropoeze (*eng. Erythropoiesis stimulating agents*, ESAs) primenom rekombinantne DNK tehnologije i uvođenje u terapiju ESAs predstavljaju prekretnicu koja se smatra velikim uspehom u lečenju anemije u sklopu HBS (171-173, 179, 224). ESAs, kao i endogeni eritropoetin, stimulišu diferenciranje i proliferaciju eritroidnih prekursora u koštanoj srži, oslobađanje retikulocita u cirkulaciju i podstiču sintezu hemoglobina (10, 13, 216).

Primena agenasa stimulacije eritropoeze dovodi do povećane mobilizacije gvožđa potrebnog za ubrzanu eritropoezu i razvoj apsolutnog nedostatka gvožđa ukoliko depoi gvožđa nisu adekvatno popunjeni. Imajući u vidu „sklonost“ ka razvoju deficita gvožđa, primena parenteralnih preparata gvožđa, samostalno ili u kombinaciji sa ESAs, predstavlja osnovu lečenja anemije kod bolesnika u ESRD (171-173). Ipak, i pored terapije ESAs, 10 – 20% bolesnika ostaje anemično (10, 225). Ovaj problem jedan je od najvećih kliničkih izazova u nefrologiji, te stoga postoji potreba za potpunijem rasvetljavanju molekularnog mehanizma koji dovodi do anemije u ESRD.

Nasuprot očekivanjima, velika opservaciona studija na populaciji bolesnika na hemodijalizi nije pokazala da potpuna korekcija anemije tretmanom ESAs unapređuje opšte benefite i smanjuje rizik od smrtnog ishoda (226). Velike multicentrične randomizirane studije CREAT (227), CHOIR (228) i TREAT (229) su potpunu korekciju anemije ESAs dovele u vezu sa povećanim rizikom od smrtnog ishoda, cerebrovaskularnog insulta i neželjenim kardiovaskularnim događajima (230). Pokazano da veoma velike doze ESAs, koje su neophodne za normalizaciju koncentracija hemoglobina (neodgovarajući odgovor na terapiju ESAs, *eng. hyporesponsiveness*), jako i direktno koreliraju sa povećanim rizikom od smrtnog ishoda i kardiovaskularnih komplikacija (226, 230-232). Povišene doze ESAs mogu da doprinesu povećanom viskozitetu krvi i smanjenoj dostupnosti azot-monoksida, što zajedno vodi loše kontrolisanoj hipertenziji, a koja za posledicu može imati loš kardiovaskularni ishod. Povećana adhezivnost trombocita i viskozitet krvi, kao posledica dejstva ESAs, povećavaju rizik od tromboembolijskih događaja (10, 230). Neodgovarajući odgovor na terapiju ESAs potencijalno može biti prevaziđen intenzivnom primenom parenteralnog gvožđa (233), međutim, nekoliko istraživanja na pacijentima na dijalizi naglasilo je štetni uticaj prekomerne upotrebe *i.v.* gvožđa i povezala je sa povećanim rizikom od smrtnog ishoda (234-236). Svedoci smo da još uvek postoje razmatranja i izazovi u vezi uspostavljanja terapijske ravnoteže između

efikasnosti i bezbednosti u cilju održavanja adekvatne homeostaze gvožđa, koja je preduslov za postizanje maksimalnog benefita terapije ESAs kod bolesnika u ESRD (184, 185).

Primena parenteralnog gvožđa povećava ekspresiju hepcidina-25 pozitivnom povratnom spregom, onemogućavajući dalju apsorpciju gvožđa (236, 237). Navedeni mehanizam može dati objašnjenje za uspostavljanje „začaranog kruga“ između povišenih koncentracija hepcidina-25 i feritina. Naime, smatra se da inicijalno povećanje koncentracije feritina dovodi do povećane translacije hepcidina što za posledicu ima dalje nagomilavanje gvožđa (236, 237).

Dostizanje adekvatnog statusa gvožđa u populaciji bolesnika u ESRD je od kliničkog značaja jer su ovi pacijenti skloni negativnom balansu gvožđa zbog smanjene intestinalne apsorpcije, povećanog gubitka gvožđa i prisutne ograničene dostupnosti gvožđa (171, 172, 184, 187). Nedavna studija sprovedena na preko 2000 hemodijaliznih bolesnika je otkrila da održavanje niskih zaliha gvožđa izlaže ovu grupu pacijenta određenim rizicima (238). Sa druge strane, suplementacija *i.v.* gvožđem u cilju nadoknade gubitaka gvožđa je česta kod bolesnika u ESRD. Međutim, prekomerna primena parenteralnog gvožđa može dovesti do povećanja količine telesnog gvožđa, stanja poznatog kao „pozitivni balans gvožđa“ (187), a koji je povezan sa povećanim rizikom od potencijalne gvožđem posredovane citotoksičnosti i smrtnog ishoda (234-236, 239, 240).

Otkriće strukture i funkcije hepcidina-25 podstaklo je istraživanja koja se odnose na mogućnosti njegove kliničke primene. Kako se hepcidin-25 smatra glavnim regulatorom metabolizma gvožđa, ispitivan je intenzivno kao jedan od činilaca u nastanku anemije u HBS. Sinteza hepcidina-25 je povišena u inflamaciji, a njegovo izlučivanje smanjeno usled oštećenja bubrega, pa je i koncentracija hepcidina-25 očekivano povećana kod pacijenata sa HBS, što je i pokazano u brojnim studijama (241-246) (Slika 13). Pretpostavlja se da povišene vrednosti hepcidina-25 mogu biti osnovni uzrok neodgovarajućeg odgovora na terapiju ESAs i da određivanje nivoa hepcidina-25 može imati značajnu ulogu u bezbednijem menadžmentu anemije kod bolesnika sa HBS. Međutim, postoje neslaganja u rezultatima prethodnih istraživanja u vezi hepcidina-25 i anemije kod bolesnika sa HBS, pre svega u odnosu između nivoa hepcidina-25 u cirkulaciji sa primenom terapije ESAs i *i.v.* gvožđa (241-243, 245, 246). Negativna korelacija između doze ESAs i nivoa hepcidina-25 ukazuje na nemogućnost dijagnostičke primene hepcidina-25 kao prediktora rezistencije na ESAs (242). Druga grupa autora smatra da hepcidin-25 nije povezan sa tretmanom ESAs (245). Takođe, povezanost

kliničkih, hematoloških i biohemijskih faktora sa hepcidinom-25 u grupi HD bolesnika klasifikovanih prema primeni ESAs je nedovoljno ispitana (247, 248).

Ono što su gotovo sve studije pokazale je nedvosmislena pozitivna korelacija hepcidina-25 sa feritinom kod bolesnika sa HBS, te feritin predstavlja najjači prediktor koncentracije hepcidina-25 (179, 241-246). Iako se smatra da je sinteza hepcidina-25 stimulirana u inflamaciji, nisu sve studije na populaciji bolesnika sa HBS potvrdile povezanost koncentracije hepcidina-25 sa markerima inflamacije. Naime, rezultati istraživanja van der Weerd i sar. (245), El Sewefy i sar. (249) i Zaritsky i sar. (246) su pokazali značajnu povezanost, dok sa druge strane, Kuragano i sar. (250), Weiss i sar. (241), Touzot i sar. (247), Ashby i sar. (242), van der Putten i sar. (248) i Kato i sar. (243) nisu uspjeli da utvrde značajnu povezanost hepcidina sa markerima inflamacije.

Otkriće hepcidina-25 je izmijenilo razumevanje homeostaze gvožđa i patofiziologije anemije u inflamaciji. Smatra se da je upravo hepcidin-25 protein koji doprinosi nastanku anemije u inflamaciji. Metabolizam gvožđa je varijabilan i kompleksan proces sa dinamičkom promenom odeljaka gvožđa. Shodno tome, sveobuhvatno i tačno ispitivanje statusa gvožđa, trenutno se ne može postići korišćenjem jednog biomarkera. Kao ključni regulator sistemskog metabolizma gvožđa, hepcidin-25 je predložen kao potencijalno koristan dodatni dijagnostički alat za kliničare u proceni aktuelnog statusa gvožđa. Ipak veliki broj faktora koji mogu uticati na koncentraciju hepcidina-25 kod bolesnika u terminalnoj fazi bubrežne slabosti, uključujući primenu parenteralnog gvožđa, agenasa stimulacije eritropoeze, statusa gvožđa, inflamacije, renalnog klirensa i dijaliznog tretmana, dovode do različitih rezultata i zaključaka u do sada sprovedenim studijama. Primena hepcidina-25 kao dijagnostičkog parametra u proceni statusa gvožđa i stepena anemije, kao i predikcije neadekvatnog odgovora na ESAs terapiju u ESRD još uvek nije našla svoje mesto u rutinskoj kliničkoj praksi i dalje je predmet istraživanja.

2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog naučnog istraživanja su:

1. Odrediti koncentraciju hepcidina-25 u serumu bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolnoj grupi i utvrditi razlike u koncentraciji hepcidina-25 između ispitivanih grupa.
2. Ispitati uticaj genetskih faktora na sintezu hepcidina-25 određivanjem zastupljenosti varijante A736V u genu *TMPRSS6* i varijanti C282Y i H63D u genu *HFE*.
3. Odrediti vrednosti osnovnih i novih hematoloških parametara kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe i utvrditi razlike u dobijenim vrednostima između ispitivanih grupa.
4. Odrediti koncentraciju parametara statusa gvožđa i inflamacije u serumu bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe: gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC), saturacija transferina, transferin, feritin, sTfR, hsCRP i utvrditi razike između ispitivanih grupa.
5. Ispitati korelacije između koncentracije hepcidina-25, hematoloških parametara, markera statusa gvožđa i markera inflamacije kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti.
6. Ispitati odnos koncentracije hepcidina-25 u serumu i terapije koja se primenjuje u cilju korigovanja anemije kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti, tj. doze *i.v.* unetog gvožđa i/ili doze agenasa stimulacije eritropoeze.
7. Odrediti apsolutni broj retikulocita i vrednosti retikulocitnih indeksa i ispitati njihovu povezanost sa koncentracijom hepcidina-25 kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti.
8. Ispitati zastupljenost varijanti haplotipa C282Y i H63D *HFE* u odnosu na pol i razlika u koncentraciji hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u odnosu na C282Y i H63D *HFE*.
9. Ispitivanje dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa i određivanje granične vrednosti hepcidina-25 na osnovu koje bi se mogla razlikovati anemija hronične bolesti od sideropenijske anemije.

3. Materijali i metode

3.1. Izbor ispitanika

Istraživanje je obuhvatilo tri grupe ispitanika: bolesnike u terminalnoj fazi hronične bubrežne slabosti, pacijente sa sideropenijskom anemijom i kontrolnu grupu ispitanika. Zastupljenost polova i starost ispitanika u ispitivanim grupama prikazana je u Tabeli 5.

Tabela 5. Zastupljenost polova i starost ispitanika u ispitivanim grupama

Ispitanici	Terminalna bubrežna slabost ESRD (N = 126)	Sideropenijska anemija IDA (N = 31)	Kontrolna grupa KG (N = 30)
Pol (muškarci/žene)	72/54	0/31	14/16
Starost (godine)	28 – 89	23 – 67	26 – 83

U istraživanje je uključeno 126 ispitanika u terminalnoj bubrežnoj slabosti (ESRD) koji su lečeni na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije. Prema podeli hronične bubrežne slabosti predloženoj od strane Nacionalne fondacije za bubrežnu SAD prema vodiču KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative), terminalna bubrežna slabost predstavlja stadijum 5 HBS. Definisana je kao stanje kada je procenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR) manja od 15 mL/min/1,73 m² ili je zbog ozbiljnosti simptoma neophodno lečenje nekom od metoda zamene funkcije bubrega (172). Broj muškaraca u ESRD grupi bio je 72 (56%) i žena 54 (44%). Bolesnici u ESRD grupi su bili starosti od 28 do 89 godina.

Prema podacima dobijenim o lečenju bolesnici u ESRD grupi su podeljeni prema terapiji hemodijaliznim tretmanom. ESRD grupa je podeljena prema polu, a na osnovu koncentracije hemoglobina, na grupu anemičnih (hemoglobin < 110 g/L) i grupu bolesnika bez anemije (hemoglobin ≥ 110 g/L). Anemični bolesnici u ESRD su dalje klasifikovani na osnovu Thomasovog algoritma u cilju detektovanja deficita gvožđa, a zatim i prema procenjenom balansu statusa gvožđa. Na osnovu podataka o lečenju anemije, bolesnici na hemodijaliznom tretmanu su podeljeni na grupu na terapiji ESAs i grupu bez terapije ESAs.

Grupu ESRD bolesnika sačinjavalo je 103 bolesnika lečenih hroničnim programom hemodijalize (ESRD-D) i 23 bolesnika u predijaliznom stadijumu (ESRD-PD) (Tabela 6).

Tabela 6. Zastupljenost polova i starost bolesnika u ESRD-D i ESRD-PD grupi

Ispitanici	ESRD-PD (N = 23)	ESRD-D (N = 103)
Pol (muškarci/žene)	10/13	62/41
Starost (godine)	29 – 82	28 – 89

ESRD-D-grupa bolesnika lečenih hroničnim programom hemodijalize, ESRD-PD-grupa bolesnika u predijaliznom stadijumu

Grupu ispitanika sa dijagnostikovanom sideropenijskom anemijom (*eng. Iron Deficiency Anemia, IDA*) sačinjavala je 31 žena starosti od 23 do 67 godina. Kriterijumi za selekciju pacijentkinja sa dijagnozom sideropenijske anemije u IDA grupi podrazumevali su:

- koncentracija hemoglobina < 110 g/L
- MCV < 80 fL
- feritin < 20 µg/L
- hsCRP < 10 mg/L.

Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (*eng. World Health Organization, WHO*) prevalenca sideropenijske anemije je viša kod žena u reproduktivnom periodu, što je i razlog zašto je IDA grupa sačinjena samo od ispitanika ženskog pola (251).

Kontrolna grupa (KG) je obuhvatila 30 zdravih dobrovoljaca, od kojih 14 (47%) muškog i 16 (53%) ženskog pola, starosti od 26 do 83 godine (Tabela 5). Svi ispitanici KG bili su u dobrom opštem zdravstvenom stanju i bez terapije.

3.1.1. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja

Kriterijumi za uključivanje u studiju

Podobnost za uključivanje ispitanika u studiju razmatrana je na osnovu medicinske istorije, hematoloških i biohemijskih parametara.

Kriterijumi za uključivanje u studiju podrazumevali su:

- starost ispitanika iznad 18 godina
- odsustvo akutne inflamacije
- odsustvo imunoloških oboljenja
- odsustvo infekcije virusom HIV-a.

Kriterijumi za isključivanje iz studije

- prisustvo hematoloških poremećaja

- prisustvo maligniteta
- terapija preparatima gvožđa (*i.v.* ili peroralnim) kod IDA bolesnika i kontrolne grupe

Laboratorijske analize su urađene u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije, Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Protokol studije je odobren od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, zaveden pod brojem 1230/1. Saglasnost za sprovođenje istraživanja je dobijena od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije, u Beogradu, zavedena pod brojem 93/5. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima Helsinške deklaracije poštujući načela Dobre kliničke prakse. Ispitanici su uključeni u studiju nakon potpisivanja dobrovoljnog pristanka za učestvovanje u naučnom istraživanju. Formular pod nazivom „Saglasnost za učešće u ispitivanju“ uključuje „Listu za pacijente“ putem koje su ispitanici detaljno upoznati sa značajem i ciljevima studije. Potpisivanjem navedenog formulara ispitanik potvrđuje da je upoznat da će svaki od njegovih medicinskih nalaza i uzoraka biti korišćen isključivo u medicinske svrhe i da će sve informacije koje budu sakupljene o ispitaniku biti smatrane poverljivim.

Anamnestički podaci koji uključuju starost, prisustvo imunoloških, inflamatornih, hematoloških i malignih oboljenja, infekcije virusom hepatitisa i HIV-a i primeni lekova i suplemenata pribavljeni su popunjavanjem upitnika „Podaci o ispitanicima“. Podaci o lečenju hemodijalizom, uzroku renalnog oboljenja, prisustvu komorbiditeta, vrednosti indeksa telesne mase (*eng. body mass index*, BMI) i terapiji anemije agensima stimulacije eritropoeze i intravenskim preparatima gvožđa dobijeni su analizom medicinske dokumentacije pacijenata.

Tretman bolesnika u ESRD i terapija anemije sprovedeni su u skladu sa preporukama KDIGO (*eng. Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), NKF KDOQI i UKRA (*eng. United Kindom Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease*) vodiča (171-173).

Podaci o ispitanicima

I OPŠTI PODACI

1. Ime i prezime _____

2. Godina rođenja _____

II ZDRAVSTVENI PODACI

1. Prisustvo imunoloških, inflamatornih, hematoloških, malignih oboljenja, infekcija virusom hepatitisa, HIV-a? Da Ne

Ako je odgovor potvrđan navesti koja je bolest: _____

2. Da li su primenjivani lekovi? Da Ne

Ako je odgovor potvrđan navesti primenjene lekove:

a) antihipertenzivni lekovi: _____

b) dijetetski preparati / vitamini: _____

c) stimulatori eritropoeze (vrsta i srednja doza): _____

d) intravenski primenjeno gvožđe (vrsta i srednja doza): _____

e) drugi lekovi, navesti koji: _____

III KLINIČKI PODACI

1. Da li je ispitanik na hroničnom programu hemodijalize (HD): Da Ne

Ako je odgovor potvrđan zaokružiti ili navesti:

a) Navesti osnovnu bubrežnu bolest: _____

b) Vrednost indeksa telesne mase: _____

- c) Adekvatnost HD tretmana (Kt/V): _____
- d) Modalitet HD tretmana: Hemodijaliza Hemodiafiltracija
- e) Meseci na HD: _____
- f) Protok: _____
- g) Površina biokompatibilne membrane: _____
- h) Prisustvo bubrežnih cisti: _____

3.2. Terapija hemodijalizom

Terapija hemodijalizom sprovedena je primenom biokompatibilnih membrana i bikarbonatnom tečnošću za dijalizu 3 puta nedeljno tokom najmanje 6 meseci, sa prosečnim trajanjem od 4h. Dijalizni režim je bio isti tokom trajanja studije (ukupno vreme trajanja dijalize, dijalizni protok, dijalizna temperatura i sadržaj dijalizata) sa minimalnom adekvatnošću dijalize procenjenom upotrebom indeksa Kt/V (252) od 1,2 po tretmanu.

3.3. Terapija anemije kod bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti

U cilju osiguranja tačne dijagnoze i terapije anemije, prema preporuci UKRA vodiča (173), kod svih pacijenata sa anemijom hronične bolesti povezanom sa HBS ispitan je uzrok i potencijalna terapija anemije bez obzira na stepen bubrežne slabosti ili potrebu za zamenom bubrežne funkcije ukoliko su:

- vrednosti hemoglobina (Hgb) ispod 110 g/L ili
- su razvijali simptome koji se mogu pripisati anemiji.

Nakon isključenja drugih uzroka osim HBS, terapija anemije kod bolesnika sa HBS obuhvata primenu agenasa stimulacije eritropoeze i preparata gvožđa (parenteralni ili oralni preparati gvožđa) (172, 173).

Terapija ESAs se uvodi nakon što su bolesnici ispunili sledeće kriterijume: odsustvo aktivnog krvarenja ili maligniteta, popunjenost depoa gvožđa i korigovana infekcija, i sekundarni hiperparatireoidizam. Odluka o uvođenju terapije anemije primenom ESAs je zasnovana na proceni koristi (kontrola simptoma povezanih sa anemijom i smanjenje broja transfuzija) i rizika (povećan rizik od smrtnog ishoda, ozbiljnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja) za svakog bolesnika ponaosob. Primena ESAs indikovana je kod bolesnika sa vrednostima Hgb ispod 100 g/L, a korigovanje terapije je razmatrano kada je koncentracija Hgb bila ispod 105 g/L ili iznad 115 g/L kako bi se održavao preporučeni opseg ciljnih vrednosti Hgb između 100 g/L i 120 g/L (172, 173). Efekat terapije je praćen brzinom porasta koncentracije Hgb, čija ciljna vrednost treba da iznosi približno 10 g/L mesečno, i ne treba da bude veći od 20 g/L mesečno kako bi se rizik od pogoršanja hipertenzije sveo na minimum (172).

Prema dužini delovanja ESAs su prepisivani kao dugodelujući: darbepoetin α (Amgen Europe GmbH, Švajcarska, μg), metoksi polietilen glicol-epoetin β (Roche Diagnostics GmbH, Nemačka, μg), i kratkodelujući: epoetin α (Cilag AG, Švajcarska, IU), epoetin β (Roche

Diagnostics GmbH, Nemačka, IU). Poluvremena eliminacije intravenski primenjivanih ESAs prikazana su u Tabeli 7.

Tabela 7. Poluvremena eliminacije ESAs

	Vrsta ESAs	Poluvreme eliminacije (h)
Dugodelujući	Darbepoetin α	21
	Metoksi polietilen glicol-epoetin β	134
Kratkodelujući	Epoetin α	4-8
	Epoetin β	4-12

ESAs – agensi stimulacije eritropoeze

U fazi održavanja kod bolesnika na hroničnom programu HD kratkodelujući ESAs su primenjivani tri puta nedeljno, dok su dugodelujući ESAs primenjivani jednom nedeljno ili jednom na dve nedelje (Darbepoetin α), tj. jednom mesečno (Metoksi polietilen glicol-epoetin β) intravenskim putem, na kraju dijaliznog tretmana. Početna doza ESAs je određivana na osnovu koncentracije Hgb, telesne mase i kliničkog stanja bolesnika. Prilagođavanje doze ESAs, u cilju održavanja preporučenog željenog opsega koncentracija Hgb, korigovano je individualno na osnovu trenutnog nivoa Hgb, stope promene koncentracije Hgb, trenutne doze ESAs i kliničkog stanja bolesnika (172, 173).

Prema WHO klasifikaciji lekova (*eng. WHO Drug Classification*)(253) prepisane doze ESAs u IU i μg su transformisane u preporučene dnevne doze (*eng. Daily Desirable Dose, DDD*) u toku nedelje radi postizanja uniformnog prikaza. Za darbepoetin α (ATC kod B03XA02), DDD je 4,5 μg , za metoksi polietilen glicol-epoetin β (ATC kod B03XA03), DDD je 4,0 μg , i za epoetin α i β (ATC kod B03XA01), DDD je 1000 IU.

Indeks rezistencije na ESAs (*eng. ESA Resistance Index, ERI*) je definisan kao prosečna nedeljna doza ESAs korigovana prema telesnoj masi (IU/kg/week) / prosečnom koncentracijom Hgb (g/dL), u prethodna 3 meseca [ERI = (ESA doza/telesna masa)/Hgb]. Bolesnici u najvišem kvartilu ERI su smatrani da imaju neodgovarajući odgovor Hgb na terapiju ESAs, tj. ESAs rezistentnim (254).

Kobalamin je primenjivan *i.v.* na kraju dijaliznog tretmana u dozi od 12 μg nedeljno kao kompleks B vitamina. Folna kiselina je primenjivana oralno u dozi od 5 mg nedeljno.

Prateći prihvaćene vodiče, gvožđe je aplikovano *i.v.* putem kao Fe^{3+} -hidroksid sahara kompleks (Rafarm S.A., Grčka, mg/nedeljno) u cilju preventivnog sprečavanja pražnjenja depoa, odnosno apsolutnog deficita gvožđa definisanog kao nivo feritina ispod 100 $\mu\text{g/L}$, tj. saturacije transferina ispod 20% (172, 173). Zbog rizika od opterećenja gvožđem, terapija *i.v.*

preparatima gvožđa se ukidala kada je vrednost feritina bila iznad 500 µg/L i saturacija transferina iznad 30% (172). Prema nedavno ažuriranom UKRA vodiču (173), procenjeni status gvožđa ESRD bolesnika je klasifikovan kao pozitivni balans gvožđa kada je vrednost feritina bila veća od 800 µg/L za predijalizne bolesnike, odnosno veća od 700 µg/L i saturacija transferina veća od 40% za bolesnike na hroničnom tretmanu HD (173).

3.4. Uzorkovanje

Uzorci krvi kod bolesnika na dijalizi prikupljeni su pre započinjanja dijalize u sredini nedelje, tri dana nakon poslednje terapije ESAs i najmanje jedne nedelje nakon parenteralne terapije gvožđem. Uzorci krvi od ispitanika kontrolne grupe, pacijenata sa sideropenijskom anemijom i predijaliznih bolesnika prikupljeni su prilikom redovnih kontrolnih pregleda kod ordinirajućeg lekara, nakon noćnog gladovanja.

Za potrebe istraživanja krv je uzorkovana u 3 vakuum epruvete – Vacutainer® (Becton Dickinson Vacutainer, SAD): jednu SST® II Advance – za dobijanje seruma, jednu sa 1,8 mg K₂EDTA/mL krvi za određivanje krvne slike i jednu sa 0,109 M (3,2%) Na-citratom kao antikoagulansom za izolovanje DNK. Serum je izdvajan u dve porcije nakon potpune koagulacije i centrifugiranja na 1500 g tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Određivanje koncentracije ispitivanih parametara iz seruma je vršeno odmah iz jedne porcije seruma, dok je drugi alikvot zamrzavan na -80 °C do izvođenje analize za hepcidin-25. Uzorkovanje, priprema, određivanje i čuvanje seruma na -80 °C, trajalo je od februara 2016. do maja 2017. godine u laboratoriji Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije. U istraživanju nisu korišćeni hemolizirani, ikterični i lipemični uzorci seruma.

3.5. Laboratorijske analize

Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, uključujući broj i indekse retikulocita je određena iz K₂EDTA krvi odmah nakon uzorkovanja na automatskim hematološkim analizatorima Coulter® LH750 (Beckman Coulter, Inc., SAD) i Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka) u laboratoriji Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku i laboratoriji Službe za urgentnu laboratorijsku dijagnostiku Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije. Biohemijski parametri: kreatinin, ureja, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumin, aspartat aminottransferaza (AST), alanin aminottransferaza (ALT), alkalna fosfataza, laktat dehidrogenaza (LDH), gvožđe, ukupni

kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC), hsCRP, haptoglobin, transferin i feritin su određeni na automatskom biohemijском analizatoru Olympus AU2700 (Beckman Coulter Diagnostics Inc., SAD) komercijalnim setom reagenasa istog proizvođača. Koncentracija sTfR određivana je u serumu komercijalnim imunonefelometrijskim esejom na analizatoru Siemens Dade Behring Nephelometer Analyzer II[®] (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka). Sva laboratorijska određivanja biohemijских parametara urađena su u laboratoriji Centra za medicinsku biohemiju, Služba za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog centra Srbije.

Koncentracija hepcidina-25 u serumu određena je u Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Genotipizacija *HFE* (C282Y i H63D) i *TMPRSS6* (A736V) gena urađena je u Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.5.1. Određivanje koncentracije hepcidina-25

Koncentracija hepcidina-25 u serumu određena je komercijalnim enzimskim imunosorbent testom (*eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) koji je specifičan za hepcidin-25 i namenjen za istraživački rad - Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA (Hepcidin-25 Peptide Detection) For Research Use Only (Corgenix Inc., SAD).

3.5.1.1. Princip određivanja koncentracije hepcidina-25

Princip Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA testa zasnovan je na primeni mišjih anti-humanih monoklonskih antitela specifičnih za hepcidin-25 (sendvič test) i hemiluminiscentnoj detekciji. Hepcidin-25 iz razblaženih uzoraka seruma reaguje sa monoklonskim anti-hepcidin-25 antitelima koja su imobilisana na površini čvrste faze mikrotitarskih ploča (bazen mikrotitarskih ploča).

Nakon ciklusa ispiranja seruma, detekciono monoklonsko anti-hepcidin-25 antitelo konjugovano peroksidazom formira kompleks sa vezanim hepcidinom-25 iz uzorka. Nakon sledećeg procesa ispiranja, dodaje se dvokomponentni supstrat koji generiše hemiluminiscentnu reakciju. Intenzitet hemiluminiscencije meren je na instrumentu Victor (Perkin Elmer Inc., SAD), direktno je proporcionalan koncentraciji hepcidina-25 u uzorku i izražava se u relativnim svetlosnim jedinicama (*eng. Relative light units, RLU*).

Standardna kriva zavisnosti koncentracije hepcidina-25 i intenziteta hemiluminiscencije pripremljena je serijskim razblaženjima standarda i korišćena za

određivanje koncentracije hepcidina-25. Tri nivoa komercijalnih kontrola sa visokim, umerenim i niskim koncentracijama hepcidina-25 (*eng. High, Moderate and Low Hepcidin-25 Serum Control*) određivana su pre analiziranja svake serije uzoraka.

3.5.1.2. Sastav reagensa za određivanje koncentracije hepcidina-25

Za određivanje koncentracije hepcidina-25 korišćen je set reagensa testa Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA, proizvođača Corgenix Inc., koji uključuje:

- Mikrotitarsku ploču za hemiluminiscentno ELISA određivanje sa 96 bazena obloženih mišjim Anti-Hepcidin-25 antitelima
- Hepcidin-25 Kalibrator sačinjen od rekombinantnog hepcidina-25 liofilizovanog u puferu, rekonstituiše se diluentom za uzorke (1,0 mL)
- Kontrolne serume sa visokim, umerenim i niskim koncentracijama hepcidina-25 (*eng. High, Moderate and Low Hepcidin-25 Serum Control*) koji su sačinjeni od rekombinantnog hepcidina-25 liofilizovanog u normalnom humanom serumu, rekonstituiše se dejonizovanom vodom (0,5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta. Opseg vrednosti koncentracija kontrolnih uzoraka:

Hepcidin-25 Low Serum Control (16,5-30,7) µg/L

Hepcidin-25 Moderate Serum Control (47,0-70,5) µg/L

Hepcidin-25 High Serum Control (122,0-183,0) µg/L

- Hepcidin-25 diluent za uzorke (*eng. Hepcidin-25 Sample Diluent*), 50 mL
- Koncentrat mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom (*eng. Anti-Hepcidin-25-HRP Conjugate Concentrate*), 0,25 mL
- Diluent za koncentrat mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom (*eng. Anti-Hepcidin-25-HRP Conjugate Diluent*) 15 mL
- Komponentu A Hepcidin-25 supstrata (*eng. Hepcidin-25 Substrate Component A*) (sadrži stabilizovan vodonik peroksid), 7 mL
- Komponentu B Hepcidin-25 supstrata (*eng. Hepcidin-25 Substrate Component B*) (rastvor za pojačavanje luminiscencije, *eng. luminal enhancer solution*), 7 mL

Hepcidin-25 koncentrat za ispiranje (*eng. Hepcidin-25 Wash Concentrate TBS/Tween 20, 20X*), 50 mL.

3.5.1.3. Postupak određivanja koncentracije hepcidina-25

Pre izvođenja analize uzorci seruma i set reagensa se dovode na sobnu temperaturu (20 – 25 °C) i dobro promešaju (izbegava se formiranje pene).

Priprema reagenasa podrazumeva:

- Priprema rastvora za ispiranje: Odmeri se 50 mL koncentrata za ispiranje, TBS/Tween 20 i razblaži destilovanom ili dejonizovanom vodom do 1 L. Neiskorišćeni rastvor za ispiranje skladištiti se u frižideru na 2 – 8 °C. Ukoliko se pojave znaci mikrobiološke kontaminacije rastvor se obacuje.
- Priprema kalibratora: Kalibrator se rekonstituiše sa 1,0 mL rastvora za uzorke (*eng. Sample Diluent*), pažljivo promeša i ostavi 10 minuta. Kratko se promeša na vortex mešaču kako bi se osigurala resuspenzija. Rekonstituisani kalibrator je stabilan 1 nedelju na 2 – 8 °C.
- Priprema kontrolnih uzoraka: Kontrolni uzorci se rekonstituišu sa 0,5 mL dejonizovane ili destilovane vode, pažljivo promešaju i ostave 10 minuta. Kratko se promešaju na vortex mešaču kako bi se osigurala resuspenzija. Rekonstituisani kontrolni uzorci su stabilni 1 nedelju na 2 – 8 °C.

Postupak za određivanje koncentracije hepcidina-25 podrazumeva sledeće korake:

1. Sve trake sa mikrotitarskim bazenima koje neće biti korišćene se uklone sa rama ploče. Skladište se sa sredstvom za sušenje u priloženu vreću koja se može adekvatno zatvoriti.
2. Priprema kalibracione krive sa šest tačaka: Obeležavanje 6 epruveta kao Kalibrator 1 – 6.
3. Prenošnje sadržaja bočice rekonstituisanog Hecpidin-25 Kalibratora u epruvetu obeleženu Kalibrator 1
4. Prenošnje 500 µL rastvora za uzorke u epruvete 2 – 6.
5. Pipetiranje 500 µL iz epruvete 1 i prenošenje u epruvetu 2 (rastvor se dobro promeša).
6. Ponavljanje postupka dvostrukog serijskog razblaženja uzastopno do epruvete 6.
7. Koncentracija Kalibratora 1 je naznačena na nalepnici bočice. Koncentracije Kalibratora 2 – 6 se izračunavaju deljenjem vrednosti koncentracije Kalibratora 1 sa faktorom razblaženja (*eng. Dilution Factor, DF*).

Tabelarni prikaz primera pripreme kalibracione krive dat je u Tabeli 8.

Tabela 8. Primer pripreme kalibracione krive

Kalibrator	DF	Zapremina koju treba dodati	Zapremina rastvora za uzorke	Koncentracija kalibratora ($\mu\text{g/L}$)
1	-	1000 μL Kalibrator	0 μL	= 240 (primer)
2	2	500 μL Kalibrator 1	+ 500 μL	= 120
3	4	500 μL Kalibrator 2	+ 500 μL	= 60
4	8	500 μL Kalibrator 3	+ 500 μL	= 30
5	16	500 μL Kalibrator 4	+ 500 μL	= 15
6	32	500 μL Kalibrator 5	+ 500 μL	= 7,5

DF - faktor razblaženja

8. Kontrola u vidu slepe probe reagensa se određuje na svakoj mikrotitarskoj ploči. U narednim koracima analiziranja bazeni mikrotitarske ploče sa slepom probom reagensa se tretiraju kao i bazeni sa uzorcima.

9. Pripremanje 1:101 razblaženja kontrolnih i uzoraka seruma sa diluentom za uzorke (primer: 10 μL uzorka se dodaje u 1000 μL diluenta za uzorke što predstavlja 1:101 razblaženje uzorka).

10. Sva razblaženja se dobro promešaju i 100 μL razblaženih kalibratora, kontrolnih i uzoraka seruma se prenose u odgovarajuće bazene mikrotitarske ploče. Preporučeno je određivanje u duplikatu. Prekrivanje ploče adhezivnom folijom i inkubiranje 60 minuta uz mešanje na 600 rpm na sobnoj temperaturi (20 – 25 °C).

11. Nakon inkubacije sledi ciklus od 3 ispiranja sa 300 μL /bazenu razblaženog rastvora za ispiranje.

11.1 Manuelno ispiranje: pažljivo se okrene ploča i isprazni tečnost. Ne dozvoliti da uzorci seruma kontaminiraju bazene. Svaki bazen se kompletno popuni rastvorom za ispiranje prilikom pranja. Okvir mora biti stisnut u sredini na vrhu i dnu kako bi zadržao trake sa bazenima tokom pranja. Nakon završnog pranja, nekoliko puta čvrsto tapkati po upijajućem papiru da bi se uklonili ostaci tečnosti za ispiranje. Ne dozvoliti da se bazeni isuše između koraka.

12. Odgovarajuća količina koncentrata mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom (*eng. Anti-Hepcidin-25-HRP Conjugate Concentrate*) se razblažuje u odnosu 1:101 sa diluentom za koncentrat mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom (*eng. Anti-Hepcidin-25-HRP Conjugate Diluent*), (primer: 120 μL koncentrata mišjih Anti-

Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom dodatih u 12 mL Diluenta za koncentrat mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela predstavlja 1:101 razblaženje. Rastvor se pažljivo promeša inverzijom.

13. Nanošenje 100 μ L razblaženih mišjih Anti-Hepcidin-25 antitela obeleženih peroksidazom u svaki bazen mikrotitarske ploče.

14. Prekrivanje mikrotitarske ploče adhezivnom folijom i inkubiranje 60 minuta uz mešanje na 600 rpm na sobnoj temperaturi (20 – 25 °C).

15. Odmah nakon ispiranja ploče, se rastvor od istih zapremina Komponente A Supstrata i Komponente B Supstrata u bočici za jednokratnu upotrebu, promeša inverzijom i zaštiti od svetlosti. Dvokomponentni supstrat je stabilan na sobnoj temperaturi najmanje 1h zaštićen od svetlosti

16. Ciklus od 3 ispiranja ploče kao što je navedeno u koraku 11.

17. Nanošenje 100 μ L rastvora supstrata A i B. Odmah nakon nanošenja supstrata, postavlja se ploča u luminiscentni čitač i započinje program očitavanja. Imati na umu da će supstrat ostati proziran i neće promeniti boju.

18. Ako je moguće, čitač luminiscentne ploče se podešava da meša 5 sekundi i inkubira 1 – 2 minuta pre čitanja. Ovo omogućava ravnomernu raspodelu reagensa i stabilizaciju reakcije.

Napomena: Signal je maksimalan nekoliko minuta nakon dodavanja supstrata. Intenzitet signala se polako smanjuje tokom vremena. Supstrat se dodaje neposredno pre očitavanja da bi se postigli konzistentni rezultati.

Rezultati

1. Srednja vrednost RLU se izračunava za duplikate razblaženih kalibratora, slepe probe reagensa, uzoraka kontrola i seruma.

2. Formira se standardna kriva zavisnosti koncentracije hepcidina-25 i RLU.

3. Jedinice određenih rezultata su μ g/L = ng/mL. Nije potrebno množiti rezultate sa faktorom razblaženja od 100.

4. Proverava se ispunjenost svih parametara kontrole kvaliteta pre izveštavanja rezultata ispitivanja.

5. Nova kalibraciona kriva se priprema uz svako izvođenje analize.

Pouzdanost određenih koncentracija hepcidina-25 redovno je proveravana primenom principa unutrašnje kontrole kvaliteta rada koja je uključivala:

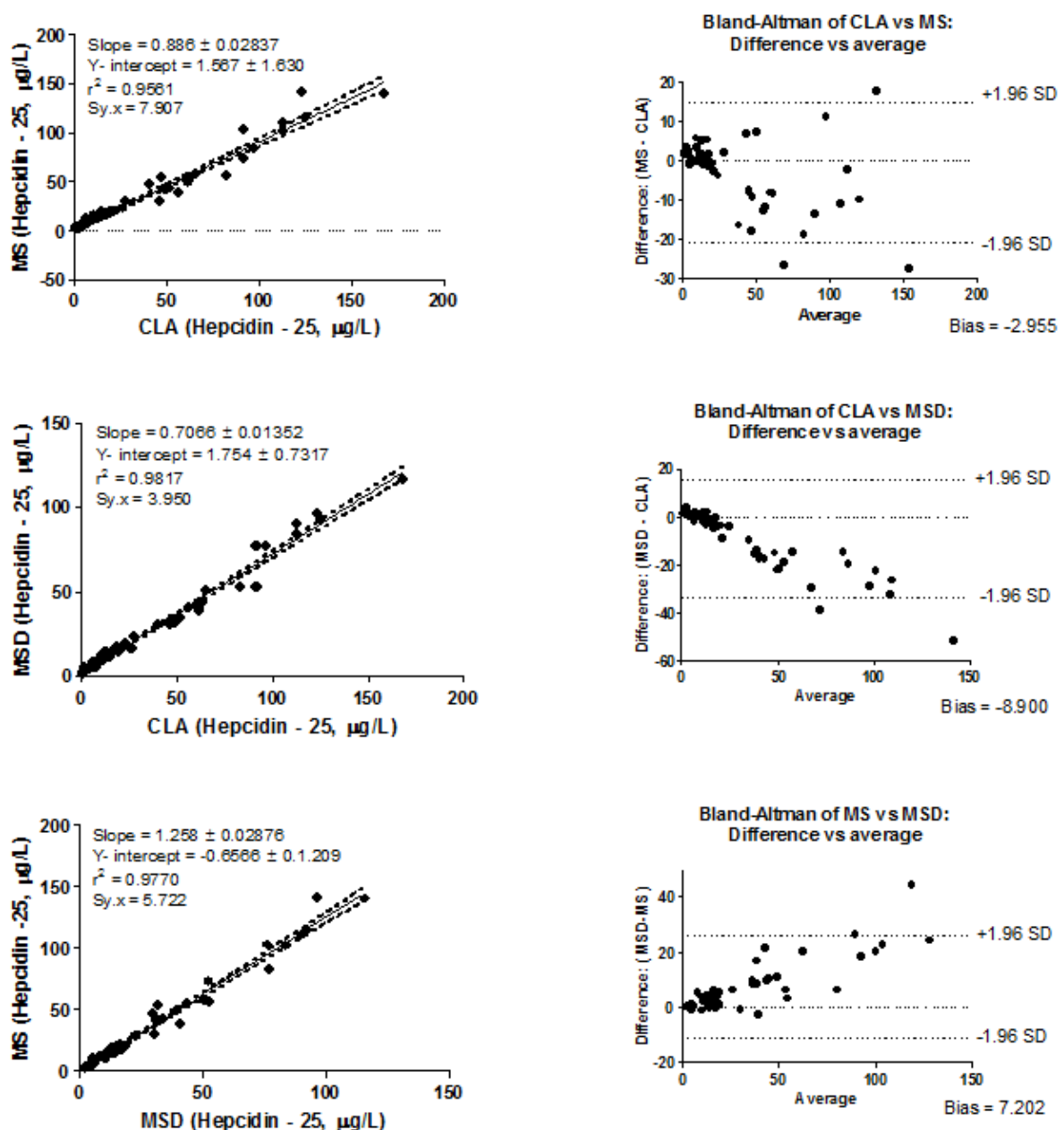
- Koeficijent varijacije (Kv) svake tačke standardne krive treba da bude manji od 20% za tačke čija je koncentracija veća od 20 μ g/L.

- Izračunate srednje vrednosti kontrolnih uzoraka treba da budu u okviru opsega određenih od strane proizvođača i naznačenih na nalepnicama kontrolnih uzoraka.
- Srednja vrednost RLU slepe probe reagensa treba da bude manja od RLU vrednosti za Kalibrator 6.

3.5.2. Analitičke karakteristike testa za određivanje koncentracije hepcidina-25

Sledljivost

Tokom proizvodnje testa i analiziranja uzoraka seruma ispitanika nije postojao internacionalno prepoznat standard dostupan u svrhu sledljivosti. Komparativna studija između Corgenix Hepcidin-25 hemiluminiscentne ELISA metode, metode masene spektrometrije zasnovane na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz supstrata povezanoj sa analizatorom masa na bazi vremena preleta – SELDI-TOF (*eng. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight*) i elektrohemiluminiscentne metode na 58 uzoraka seruma izvršena je od strane proizvođača. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su na Slici 15.



Slika 15. Poređenje metoda za određivanje hepcidina-25 sprovedeno od strane proizvođača reagensa. Humani serumi su analizirani Corgenix Hepcidin-25 hemiluminiscentnom ELISA metodom (CLA), elektrohemiluminiscentnom metodom (MSD) i SELDI-TOF masenospektrometrijskom metodom (MS). Poređenje metoda izvršeno je Bland-Altman statističkom analizom.

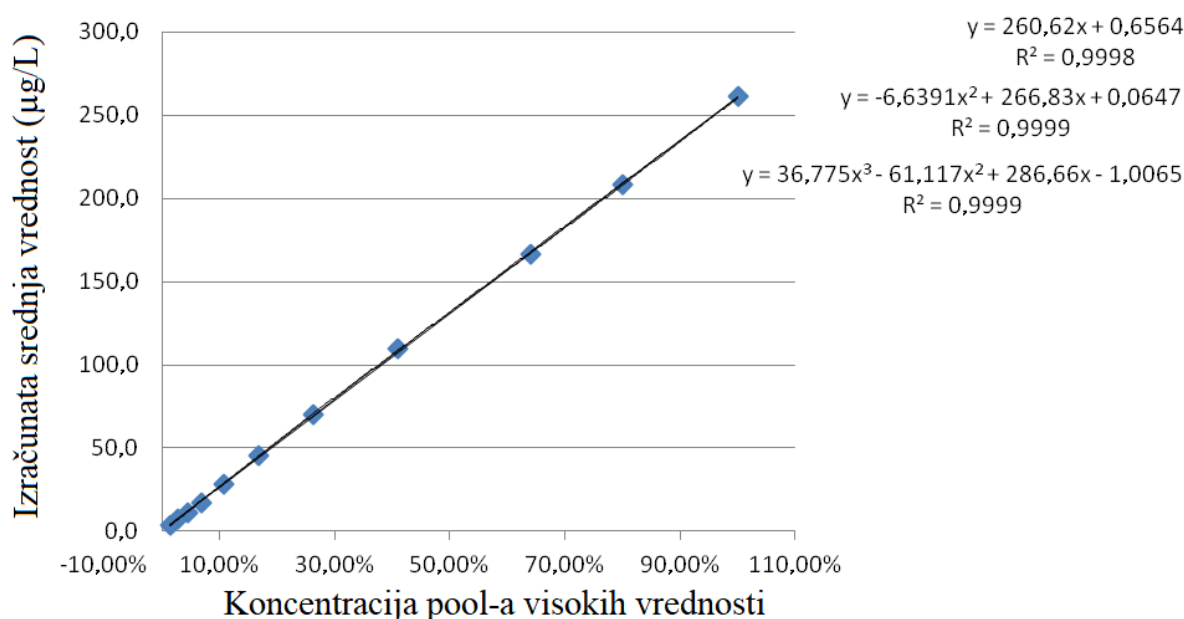
Granica detekcije

Na osnovu podataka dobijenih od strane proizvođača reagensa granica detekcije za Hepcidin-25 je iznosila $7,84 \mu\text{g/L}$ i određena je prema CLSI EP17-A protokolu analiziranjem 120 uzoraka, korišćenjem dva serijska broja reagensa Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA, radom dva operatera tokom više dana. Granica slepe probe (*eng. limit of blank, LoB*) je iznosila $3,88 \mu\text{g/L}$, dok je granica kvantifikacije (*eng. limit of*

quantitation, LoQ) od 10,00 µg/L utvrđena na osnovu 60 određivanja 4 uzorka. Bias ± 2 Sd za ovaj nivo je iznosio 7,45 – 11,02 µg/L što je bilo u okviru ciljnih granica ukupne greške.

Linearnost

Prema podacima proizvođača reagensa linearnost Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA testa određena prema CLSI EP6-A protokolu je bila od 3,74 µg/L do 260 µg/L. Grafički prikaz navedenog testiranja dat je na Slici 16 i u Tabeli 9.



Slika 16. Grafik odnosa određenih i izračunatih srednjih vrednosti koncentracija hepcidina-25

Procentualno odstupanje dobijene koncentracije hepcidina-25 u odnosu na očekivanu je bilo unutar 10% za ispitivani interval koncentracija (Slika 16, Tabela 9).

Tabela 9. Procentualno odstupanje dobijenih koncentracija hepcidina-25 u odnosu na očekivane

Stepen razblaženja	Xsr (µg/L)	Očekivana vrednost (µg/L)	Razlika (dobijena – očekivana)
100%	261,37	259,51	101%
80%	208,20	207,61	100%
64%	166,26	166,09	100%
41%	109,81	106,30	103%
26%	70,49	68,03	104%
17%	45,76	43,54	105%
10,7%	28,17	27,86	101%
6,9%	17,49	17,83	98%
4,4%	11,51	11,41	101%
2,8%	7,74	7,30	106%
1,4%	3,59	3,74	96%

Xsr – srednja vrednost

Reflex Testiranje

Prema podacima proizvođača nakon preporučenih razblaživanja uzoraka seruma (*eng. Reflex testing*) 1:21 za niske i 1:201 za visoke vrednosti, određene vrednosti su bile u okviru 20% očekivanih vrednosti za > 90% ispitanih uzoraka. Na osnovu rezultata LoQ, linearnosti i Reflex testiranja, opseg određenih vrednosti preporučen za izveštavanje je proširen na 2 – 520 µg/L.

Nepreciznost

Nepreciznost Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA testa ispitana je od strane proizvođača prema proceduri CLSI EP5-A2 korišćenjem tri nivoa kontrolnih uzoraka seruma, 3 serijska broja, analiziranjem od strane 2 operatera, 2 serije tokom dana, 2 alikvota u seriji tokom 35 kalendarskih dana (15 kalendarskih dana po serijskom broju). Podaci svih određivanja su objedinjeni i prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Nepreciznost u seriji i ukupna nepreciznost Corgenix Hepcidin-25 hemiluminiscentnog testa

Nivo testiranja	N	Xsr ($\mu\text{g/L}$)	Unutar serije Kv %	Ukupan Kv %
Nivo A	180	4,0	22,0%	23,2%
Nivo B	180	24,4	10,4%	17,0%
Nivo C	180	46,5	5,4%	12,7%
Nivo D	180	63,2	8,8%	11,8%
Nivo E	180	83,5	5,5%	12,0%
Nivo F	180	154	11,3%	11,5%

Ukrštena reaktivnost

Ukrštena reaktivnost Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA testa ispitana je poznatim izoformama hepcidina i IgM reumatoidnim faktorom od strane proizvođača reagensa prema CLSI EP7-A2 proceduri. Određeni bias na niskim, umerenim i visokim koncentracijama hepcidina-25 prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 11. Ispitivanje ukrštene reaktivnosti Corgenix Hepcidin-25 hemiluminiscentnog testa

Ispitivani reaktant ukrštene reaktivnosti	Bias (%) na svakom nivou ispitivanog analita		
	Niski nivo analita Nominalna vrednost	Srednji nivo analita Nominalna vrednost	Visok nivo analita Nominalna vrednost
	40 $\mu\text{g/L}$	80 $\mu\text{g/L}$	160 $\mu\text{g/L}$
Reumatoidni faktor	1,34%	0,08%	0,81%
Hepcidin-20	0,21%	-0,40%	0,10%
Hepcidin-22	0,14%	-0,31%	-0,28%
Hepcidin-24	0,25%	0,13%	1,09%

3.5.3. Izolacija DNK i detekcija pojedinačnih polimorfizama *TMPRSS6* i *HFE* gena

Za određivanje je korišćen uzorak krvi sa Na-citratom (0,109 M) kao antikoagulansom. Molekul DNK izolovan je standardnom metodom kolonice upotrebom komercijalnog seta reagensa QiAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen Inc., SAD), prema uputstvu proizvođača. Metoda izolacije zasnovana je na tehnologiji adsorpcije na silikatnoj membrani. Ekstrakcija DNK iz leukocita i denaturacija histona izvršena je primenom QIAGEN[®] proteaze, a delovanjem haotropnih soli i ispiranjem etanolnim puferima u dve faze omogućava se adsorbovanje DNK na silikatnoj membrani smeštenoj unutar kolona. DNK je eulirana sa

kolone puferom (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) ili destilovanom vodom i skladištena na –30 do –15 °C do analiziranja. Prema podacima proizvođača prihvatljivi opseg čistoće dobijene DNK, određene kao odnos apsorbancije na 260 i 280 nm, bio je između 1,7 i 1,9.

Genotipizacija *HFE* (C282Y i H63D) i *TMPRSS6* (A736V) gena urađena je lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (*eng. real-time Polymerase Chain Reaction*, rt PCR), zasnovanoj na TaqMan metodi. PCR reakcija izvedena je na instrumentu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Za detekciju polimorfizama pojedinačnih nukleotidnih sekvenci (SNP) korišćeni su komercijalni testovi TaqMan[®] Pre Designed SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD). Svaki esej je sadržao dva para prajmera i dve oligomerne TaqMan[®] MGB (*eng. Minor Groove Binder*) probe koje su dizajnirane da se vezuju u okviru ciljne sekvence i između mesta vezivanja prajmera. Svaka proba specifično prepoznaje polimorfno mesto pojedinačnog nukleotida, specifična je za određenu alelnu varijantu i specifično je obeležena fluorescentnom bojom na 5' kraju. TaqMan[®] MGB probe su takođe sadržale i nefluorescentni quencher (*eng. nonfluorescent quencher*, NFQ) na 3' kraju. Kada je proba intaktna, zbog svoje blizine NFQ dovodi do suprimiranja fluorescencije boje na 5' kraju mehanizmom koji se primarno zasniva na Forsterovom tipu transfera energije. NFQ eliminiše pozadinsku fluorescenciju i doprinosi boljoj senzitivnosti testa. U Tabeli 12 su prikazane sekvence proba za određivanje alela, pozicije alelnih varijanti i kataloški broj korišćenog komercijalnog eseja.

Tabela 12. Sekvence proba, pozicije alelnih varijanti i kataloški broj korišćenih TaqMan® eseja

Varijanta kataloški broj eseja polimorfizam gena	Ciljna sekvenca vezivanja probe (Fluorescentne boje vezane za alel specifične probe) Lokacija nukleotida na hromozomu
rs855791 C__3289902_10 A736V <i>TMPRSS6</i>	GCGTGGCGTCACCTGGTAGCGATAG[A/G]CCTCGCTGCAC AGGTCCTGTGGGAT [VIC/FAM] 37066896 na hromozomu 22
rs1800562 C__1085595_10 C282Y <i>HFE</i>	CCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT[G/A]CCAGGTGGAG CACCCAGGCCTGGAT [VIC/FAM] 26092913 na hromozomu 6
rs1799945 C__1085600_10 H63D <i>HFE</i>	TGACCAGCTGTTCGTGTTCTATGAT[C/G]ATGAGAGTCGC CGTGTGGAGCCCCG [VIC/FAM] 26090951 na hromozomu 6

Ukupna zapremina svake PCR reakcije iznosila je 15 µL. Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije prikazan je u Tabeli 13. Sve PCR reakcije sadržale su istu količinu TaqMan® Genotyping Master Mixa, izolovane DNK i odgovarajućeg eseja – TaqMan® Assay Working Stock.

Tabela 13. Komponente smeše pojedinačne PCR reakcije

2x TaqMan® Genotyping Master Mix	7,5 µL
20x TaqMan® Assay Working Stock	0,75 µL
izolovana DNK	2 µL
Nuclease-free H ₂ O	4,75 µL

Sve PCR reakcije odvijale su se pod identičnim uslovima, a primenjeni temperaturni režim preporučeni od strane proizvođača za sve TaqMan® eseje prikazan je u Tabeli 14.

Tabela 14. Protokol PCR reakcija korišćen za detekciju genotipova *TMPRSS6* i *HFE* gena pomoću TaqMan[®] eseja

Broj ciklusa	Proces	Temperatura	Vreme
1	„Pre-read run“ ^a	60 °C	1 minut
1	Inicijalna denaturacija	95 °C	10 minuta
40	Denaturacija	95 °C	15 sekundi
	Hibridizacija i elongacija	60 °C	1 minut
1	„Post-read run“ ^b	60 °C	1 minut

^a- određivanje početnog nivoa fluorescencije; ^b- određivanje fluorescencije i „poništanje“ početnog nivoa fluorescencije

3.5.4. Određivanje hematoloških parametara

Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, uključujući i apsolutni broj retikulocita, prosečnu zapreminu retikulocita (*eng. Mean Reticulocyte Volume, MRV*) i frakciju nezrelih retikulocita (*eng. Immature Reticulocyte Fraction, IRF*) analizirana je metodom protočne citometrije (*eng. flow cytometry*) na automatskom hematološkom analizatoru Coulter[®] LH750 (Beckman Coulter, Inc., SAD) korišćenjem VCS tehnologije (*eng. volume, conductivity, light scatter*). Indeks LHD% (*eng. Low hemoglobin density*) izveden je korišćenjem prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (*eng. Mean cellular hemoglobin concentration, MCHC*) i matematičke sigmoidne transformacije: $LHD\% = \sqrt{(1 - (1 / (1 + (\text{EXP}(1,8(30 - MCHC))))))} \times 100$. Indeks RSf (*eng. Red blood cell size factor*) izračunat je primenom jednačine: $RSf = [\sqrt{(MRV \times MCV)}]$, dok je Indeks Maf (*eng. Microcytic anemia factor*) izračunat prema formuli $Maf = ((Hgb \times MCV) / 100)$.

Procenat populacije hipohromnih eritrocita (*eng. % of Hypochromic red blood cells, %HYPO*) i sadržaj Hgb u retikulocitima (*eng. Reticulocyte hemoglobin content, CHr*) određeni su na hematološkom analizatoru Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka). Za kontrolu kvaliteta rada hematoloških analizatora koristio se set od 3 nivoa komercijalne kontrole pre svake serije analiziranja uzoraka ispitanika.

3.5.5. Određivanje biohemijskih parametara

Određivanje koncentracije serumskog gvožđa

Princip metode se zasniva na oslobađanju gvožđa iz kompleksa sa transferinom u kiseloj sredini. Istovremeno HCl i Na-askorbat redukuju oslobođeni Fe^{3+} do Fe^{2+} koji u reakciji

sa hromogenom TPTZ-om (2,4,6-tri-(2-piridil)-5-triazin) formira plavo obojen kompleks čija se apsorbanija meri bihromatski na 600/800nm. Povećanje apsorbanije direktno je proporcionalno koncentraciji gvožđa vezanog za transferin. Za kalibraciju testa korišćen je standard koji je sledljiv referentnom materijalu NIST (*eng. National Institute of Standard and Technology*) SRM (*eng. Standard Reference Material*) 1598 i SRM 937. Prema uputstvu proizvođača testa nepreciznost u seriji je < 3% i < 5% ukupno.

Određivanje slobodnog kapaciteta vezivanja gvožđa (UIBC), ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa (TIBC) i procenta saturacije transferina gvožđem (TSAT)

Princip određivanja UIBC zasniva se na dodatku Fe^{2+} jona u višku, koji se u alkalnoj sredini specifično vezuju za slobodna mesta za vezivanje gvožđa na transferinu. Preostali nevezani joni gvožđa reaguju sa Nitroso-PSAP [2-Nitroso-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)fenolom] pri čemu se formira kompleks zelene boje. Razlika izmerene apsorbanije i apsorbanije koja je rezultat ukupne količine gvožđa dodatog u višku odgovara količini gvožđa koja se vezala za transferin, odnosno slobodnom kapacitetu za vezivanje gvožđa-UIBC.

Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC) i saturacija transferina gvožđem (TSAT) izračunati su pomoću formula:

$$TIBC = \text{gvožđe u serumu} + \text{UIBC}$$

$$TSAT (\%) = (\text{gvožđe u serumu} / TIBC) \times 100$$

Određivanje koncentracije solubilnih transferinskih receptora (sTfR)

Metoda se zasniva na rasipanju snopa svetlosti od strane imunskih kompleksa stvorenih prilikom mešanja polistirenskih čestica obloženih monoklonskim anti-humanim sTfR antitelima sa uzorkom koji sadrži sTfR. Koncentracija sTfR u uzorku direktno je proporcionalna intenzitetu rasute svetlosti. Za kalibraciju testa korišćeni su standardi koji su sledljivi prema radnim kalibratorima proizvođača. Sledljivost je zasnovana na EN ISO 17511 protokolu. Prema podacima proizvođača nepreciznost korišćene metode kreće se u opsegu 1,4 – 1,9% u seriji i 1,5 – 2,1% ukupno.

Određivanje koncentracije feritina

Princip metode se zasniva na rasipanju snopa svetlosti od strane imunskih kompleksa stvorenih prilikom mešanja polistirenskih lateks čestica obloženim poliklonskim žućjim anti-feritin antitelima sa uzorkom koji sadrži feritin. Za kalibraciju testa korišćeni su standardi koji su sledljivi prema trećem internacionalnom standardu za feritin, NIBSC 94/572. Sledljivost je bazirana na protokolu EN ISO 17511. Prema podacima proizvođača reagensa korišćena metoda ima koeficijent varijacije u seriji < 8%, i ukupnu nepreciznost < 11%.

Određivanje koncentracije transferina

Princip određivanja se zasniva na imunoturbidimetrijskoj metodi sa kozjim anti-humanim transferin antitelima. Za kalibraciju testa korišćeni su standardi koji su sledljivi prema internacionalnom referentnom materijalu Internacionalne federacije za kliničku hemiju (IFCC) CRM470. Prema podacima proizvođača reagensa korišćena metoda ima koeficijent varijacije u seriji < 3%, i ukupnu nepreciznost < 5%.

Određivanje koncentracije haptoglobina

Princip određivanja se zasniva na imunoturbidimetrijskoj metodi sa kozjim anti-humanim haptoglobin antitelima. Kalibracija testa izvršena je standardima koji su sledljivi prema internacionalnom referentnom materijalu IFCC CRM470. Prema podacima proizvođača reagensa koeficijent varijacije testa u seriji je < 5%, a ukupna nepreciznost < 10%.

Određivanje aktivnosti LDH

Princip određivanja LDH zasniva se na reakciji u kojoj se katalitičkim dejstvom LDH Laktat i NAD^+ konvertuju u piruvat i NADH. Stepenn promene apsorbancije na 340 nm direktno je proporcionalan aktivnosti LDH u uzorku. Test je kalibrisan na osnovu eksperimentalno utvrđenom molarnom apsorpcionom koeficijentu na 340/660 nm. Prema podacima proizvođača reagensa metoda ima nepreciznost u seriji < 5%, i ukupnu nepreciznost < 10%.

Određivanje aktivnosti AST

Princip optimizirane IFCC metode zasniva se na AST katalitički posredovanom prenosu amino grupe sa L-aspartata na α -oksoglutarat, pri čemu nastaju oksalacetat i L-glutamat. Oksalacetat se dalje, u indikatorskoj reakciji, u prisustvu koenzima NADH dejstvom malat dehidrogenaze redukuje do L-malata. Brzina oksidacije NADH, tj. smanjenje intenziteta

apsorbancije na 340 nm, direktno je proporcionalno aktivnosti AST u uzorku. Kalibracija testa zasnovana je na eksperimentalno određenom molarnom apsorpcionom koeficijentu na 340/660 nm. Prema podacima proizvođača reagensa metoda ima koeficijent varijacije u seriji < 5%, i ukupnu nepreciznost < 10%.

Određivanje aktivnosti ALT

Princip optimizirane IFCC metode se zasniva na ALT katalitički posredovanom prenosu amino grupe sa L-alanina na α -oksoglutarat, pri čemu nastaju piruvat i glutamat. Piruvat se dalje, u indikatorskoj reakciji, u prisustvu koenzima NADH katalitičkim dejstvom laktat dehidrogenaze redukuje do L-laktata. Brzina oksidacije NADH, tj. smanjenje intenziteta apsorbcije na 340 nm, direktno je proporcionalno aktivnosti ALT u uzorku. Kalibracija testa zasnovana je na eksperimentalno određenom molarnom apsorpcionom koeficijentu na 340/660 nm. Prema podacima proizvođača reagensa korišćena metoda ima koeficijent varijacije u seriji < 5%, dok je ukupna nepreciznost < 10%.

Određivanje aktivnosti ALP

Princip metode određivanja aktivnosti ALP zasniva se na merenju brzine prevođenja p-nitrofenilfosfata (pNPP) do p-nitrofenola (pNP) u prisustvu 2-amino-2-metil-1-propanola, cinka i magnezijuma u baznoj sredini. Promena apsorbcije merena bihromatski na 410/480 nm direktno je proporcionalna aktivnosti ALP u ispitivanom uzorku. Procedura kalibracije zasnovana je na bihromatskom ekstinkcionom koeficijentu za pNP čiji je molarni apsorpcioni koeficijent 17900 na 410/480 nm. Prema podacima proizvođača reagensa korišćena metoda ima nepreciznost unutar serije < 5%, i ukupnu nepreciznost < 10%.

Određivanje koncentracije kreatinina

Princip kinetičke Jaffé metode se zasniva na reakciji između kreatinina i pikrinske kiseline u alkalnoj sredini pri čemu se formira žuto-narandžasto obojeni kompleks. Koncentracija kreatinina u uzorku proporcionalna je brzini promene apsorbcije na 520/800 nm. Za kalibraciju testa korišćen je standard koji je sledljiv prema NIST SRM 967 referentnom materijalu i referentnoj metodi masene spektrometrije sa izotopskom dilucijom (ID-MS). Prema podacima proizvođača reagensa nepreciznost određivanja u seriji je < 3%, a ukupna nepreciznost < 6%.

Određivanje eGFR primenom formule zasnovane na koncentraciji kreatinina

Procenjena brzina glomerularne filtracije (*eng. Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR*) izračunata je primenom Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (255) jednačine koja glasi:

$$\text{eGFR (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 30849 \times (\text{standardizovan kreatinin } (\mu\text{mol/L}))^{-1,154} \times (\text{starost (godine)})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za osobe ženskog pola}) \times (1,212 \text{ ako osoba pripada crnoj rasi}).$$

Određivanje koncentracije ureje

Princip metode se zasniva na enzimskoj hidrolizi ureje ureazom pri čemu nastaju amonijak i ugljen dioksid. U reakciji katalizovanoj L-glutamat dehidrogenazom (GLDH), nastali amonijak sa α -ketoglutaratom i NADH gradi glutamat. Step en promene apsorbancije na talasnoj dužini od 340 nm usled oksidacije NADH direktno je proporcionalan koncentraciji ureje u uzorku. Kalibracija testa izvršena je standardom koji je sledljiv prema internacionalnom referentnom materijalu NIST SRM 909b. Prema podacima proizvođača nepreciznost određivanja u seriji je < 3%, i ukupna nepreciznost je < 5%.

Određivanje koncentracije mokraćne kiseline

Princip metode se zasniva na enzimski posredovanom prevođenju mokraćne kiseline do alantoina i vodonik peroksida (H₂O₂) pod dejstvom urikaze. Nastali H₂O₂ određuje se Trinderovom reakcijom. Formirani H₂O₂ pod dejstvom peroksidaze i u prisustvu N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilalanin, dinatrijumova so (MADB) reaguje sa 4-aminoantipirinom pri čemu nastaje hromofor plave boje čija se apsorbancija meri na 660/800 nm. Koncentracija mokraćne kiseline u uzorku proporcionalna je intenzitetu formirane boje. Kalibracija testa je izvršena standardom koji je sledljiv prema internacionalnom referentnom materijalu NIST SRM 909b. Prema podacima proizvođača nepreciznost određivanja u seriji je < 2%, a ukupna nepreciznost je < 3%.

Određivanje koncentracije ukupnih proteina u serumu

Princip metode se zasniva na reakciji između proteina i polipeptida koji sadrže najmanje dve peptidne veze sa jonima bakra u alkalnoj sredini pri čemu se formira ljubičasto obojen kompleks. Koncentracija proteina u uzorku direktno je proporcionalna apsorbanciji kompleksa na 540/600 nm. Kalibracija testa je izvršena standardom koji je sledljiv prema internacionalnom referentnom materijalu NIST SRM 927a. Prema podacima proizvođača nepreciznost određivanja u seriji je < 3% i < 4% ukupno.

Određivanje koncentracije albumina

Princip određivanja se zasniva na reakciji albumina sa bojom bromkrezolzeleno u kiseloj sredini pri čemu nastaje intenzivno obojen zeleni kompleks. Koncentracija albumina u uzorku direktno je proporcionalna apsorbanciji formiranog kompleksa koja se meri bihromatski na 600/800 nm. Za kalibraciju testa korišćen je standard koji je sledljiv prema internacionalnom referentnom materijalu za serumski protein broj 4 CAP (*eng. College of American Pathology*). Prema podacima proizvođača koeficijent varijacije određivanja u seriji je < 3%, a ukupna nepreciznost < 3%.

Određivanje koncentracije visoko-osetljivog C-reaktivnog proteina (*eng. High-sensitivity C-reactive protein, hsCRP*)

Princip imunoturbidimetrijske metode zasnovan je na stvaranju nerastvorljivih kompleksa u imunohemijskoj reakciji između žućjih anti-humanih CRP antitela, kojima su obložene lateks čestice, i CRP iz uzorka ispitanika. Apsorbancija nerastvorljivih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP u uzorku. Kalibracija testa je urađena standardom (nivo 3, 4, 5 za senzitivnu aplikaciju) koji je sledljiv prema standardu IFCC CRM 470. Prema podacima proizvođača nepreciznost određivanja u seriji je $\leq 5\%$, a ukupna nepreciznost je $\leq 10\%$.

3.6. Statistička obrada podataka

Raspodela kontinuiranih podataka je testirana Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom. Parametri čija je distribucija pratila normalnu raspodelu izraženi su kao aritmetička sredina (\bar{X}_{sr}) \pm standardna devijacija (Sd), a parametri čija distribucija nije imala odlike Gauss-ove raspodele kao medijana (ME) i interkvartilni opseg (IO). Značajnost razlike kontinuiranih podataka analizirana je primenom t-testa, jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), dvofaktorske ANOVA-e (za *post hoc* analizu primenjen je *Least significant difference* test i *Sidak multiple comparison* test), analize kovarijanse (ANCOVA), Mann-Whitney *U* i Kruskal-Wallis testa, u zavisnosti od oblika raspodele. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim brojem i procentom, a upoređivani su *Chi*-kvadrat testom ili Fisher-ovim testom tačne verovatnoće. Međuzavisnost ispitivanih parametara analizirana je primenom *Spearman* i *Pearson* korelacione analize, a zatim i multiplom linearnom regresionom analizom. Analizom Receiver Operating Characteristic (ROC) krivih procenjene su dijagnostičke karakteristike parametara statusa gvožđa kao i determinacija optimalnih graničnih vrednosti.

Devijacija distribucije genotipova u odnosu na Hardy–Weinberg equilibrium je urađena korišćenjem *Chi*-kvadrat testa za svaku kohortu ili Fisher-ovog testa tačne verovatnoće ukoliko je broj slučajeva bio < 5 . *Post hoc* analiza statističke snage za polimorfizme pojedinačnih nukleotida (SNPs) varijante A736V u genu *TMPRSS6* i varijante *HFE* gena (C282Y i H63D) sprovedena je korišćenjem softvera QUANTO, verzija 1.2 (256). Analiza haplotipova dva pojedinačna polimorfizma *HFE* gena (H63D i C282Y) izvršena je Haplotype analysis softverom, verzija 1.05 (257). Nivo statističke značajnosti bio je definisan *P* vrednošću $< 0,05$.

Za statističku analizu primenjen je program SPSS® verzije 20.0 i 21.0 (IBM® Corp., SAD).

4. Rezultati

4.1. Opšti podaci o ispitanicima

U ovom istraživanju učestvovalo je 126 pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne slabosti od kojih je 103 bolesnika bilo na hroničnom programu hemodijalize. Rezultati ove grupe poređeni su sa rezultatima 31 pacijentkinje sa sideropenijskom anemijom i 30 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu grupu. U Tabeli 15 je dat tabelarni prikaz kliničkih karakteristika bolesnika u krajnjem stadijumu hronične bubrežne slabosti.

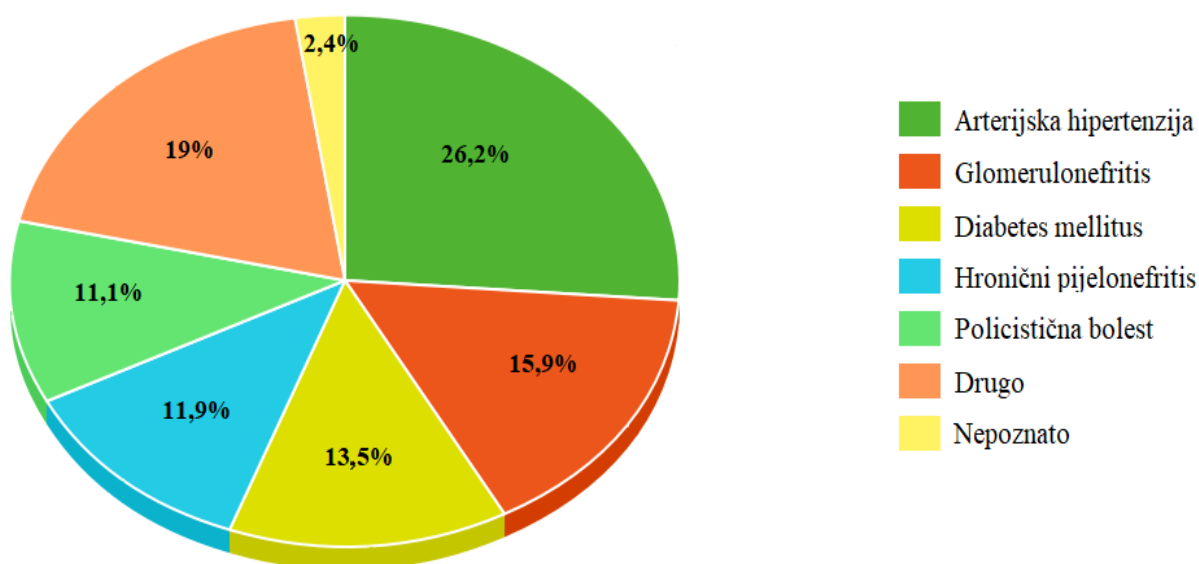
Tabela 15. Kliničke karakteristike bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti

Parametri	ESRD (N = 126)
Indeks telesne mase (kg/m ²) §	22,8 (20,8 – 26,4)
<i>Komorbiditeti (%)</i>	
Cerebrovaskularni insult	4
Infarkt miokarda	12
Arterijska hipertenzija	73
Diabetes mellitus	18
Infekcija hepatitis B ili C	22
<i>Karakteristike dijaliznog tretmana</i>	
Period lečenja dijaliznim tretmanom (meseci) §	91 (35 – 183)
Kt/V po dijaliznom tretmanu §	1,54 (1,38 – 1,72)
Protok krvi (mL/min) §	296 (272 – 300)
Modalitet (hemodijaliza/hemodijafiltracija) §	80/23
<i>Terapija anemije</i>	
Tretman ESAs (%)	51
DDD nedeljno †	4,00 (2,33 – 6,00)
ERI †	8,61 (3,93 – 11,62)
Tretman <i>i.v.</i> gvoždem (%)	56
Doza <i>i.v.</i> gvožđa (mg nedeljno) ‡	300 (300 – 600)

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) i procenat (%); ESRD – terminalni stadijum hronične bubrežne slabosti, § – kod bolesnika lečenih hroničnim tretmanom hemodijalize, Kt/V – indeks adekvatnosti hemodijalize, ESAs – agensi stimulacije eritropoeze, DDD – dnevna preporučena doza, ERI – indeks rezistencije na ESAs, *i.v.* – intravenski; † – kod bolesnika koji su na terapiji ESAs; ‡ – kod bolesnika na terapiji *i.v.* gvoždem

Prema postavljenim ciljevima studije bolesnici u ESRD su podeljeni u grupe prema: lečenju hemodijaliznim tretmanom, prisustvu anemije i polu. Grupa bolesnika u ESRD lečena hemodijaliznim tretmanom je podeljena prema primeni ESAs i dalje analizirana. Anemični bolesnici u ESRD su klasifikovani prema prisustvu deficita gvožđa na osnovu Thomasovog algoritma. Takođe, anemični bolesnici u ESRD su podeljeni prema balansu statusa gvožđa prema nedavno ažuriranim kriterijumima UKRA vodiča (173).

Uzroci hronične bubrežne slabosti kod ispitivanih pacijenata prikazani su na Slici 17. Najzastupljeniji uzrok terminalne bubrežne slabosti bila je arterijska hipertenzija (26,2%), zatim slede glomerulonefritis (15,9%), diabetes mellitus (13,5%), hronični pijelonefritis (11,9%) i policistična bolest (11,1%). Kod 2,4% pacijenata nije utvrđen uzrok HBS.



Slika 17. Uzroci hronične bubrežne bolesti

Tabelarni prikaz korišćenih lekova u ESRD grupi bolesnika prikazan je u Tabeli 16.

Tabela 16. Medikamentozna terapija bolesnika u ESRD

Ispitivani parametri	ESRD (N = 126)
Primena lekova	
Insulin (%)	15
Inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (%)	37
Beta-blokatori (%)	50
Blokatori kalcijumovih kanala (%)	41
Blokatori angiotenzinskih receptora (%)	9
Acetilsalicilna kiselina (%)	20
Statini (%)	11
Jonoizmenjivačka smola (%)	27
Inhibitori protonske pumpe (%)	57
Vitamin D (%)	34
Folna kiselina (%)	55
Kobalamin (%)	56

Najčešće korišćeni lekovi kod bolesnika u ESRD grupi bili su inhibitori protonske pumpe, terapija kobalaminom i folnom kiselinom, i primena beta-blokatora.

Statistički značajna razlika je postojala prema starosti ispitanika između ESRD, IDA i KG. Starost bolesnika ESRD grupe bila je statistički značajno viša u odnosu na KG i IDA grupu ($P < 0,001$) dok između kontrolne i IDA grupe nije utvrđena statistički značajna razlika ($P = 0,716$). Utvrđeno je da se zastupljenost muškaraca i žena u grupi ESRD (72 muškaraca/54 žene) u odnosu na KG (14 muškaraca/16 žena) nije statistički značajno razlikovala ($P = 0,300$).

4.2. Biohemijski i hematološki parametri

Tabelarni prikaz biohemijskih parametara u ESRD, IDA i KG ispitanika dat je u Tabeli 17.

Tabela 17. Biohemijski parametri

Ispitivani parametri	ESRD (N = 126)	IDA (N = 31)	KG (N = 30)	P
Ureja (mmol/L)	19,90 ^{a, b} (17,02-23,22)	4,00 (3,40-4,90)	4,25 (3,68-5,60)	< 0,001
Kreatinin (μmol/L)	766,00 ^{a, b} (592,25-913,25)	65,00 (58,00-70,00)	70,00 (63,00-85,75)	< 0,001
Mokraćna kiselina (mmol/L)	332 ^{a, b} (300-389)	224 (194-289)	270 (220-335)	< 0,001
hsCRP (mg/L)	2,70 ^{a, b} (1,50-7,90)	1,20 (0,50-3,00)	0,70 (0,20-1,13)	< 0,001
Haptoglobin [#] (g/L)	1,39 ± 0,67	1,33 ± 0,55	1,14 ± 0,44	0,118
LDH (IU/L)	325 (290-367)	315 (284-342)	316 (286-35)	0,326
AST (IU/L)	15 ^{a, b} (10-20)	19 (17-22)	23 (19-27)	< 0,001
ALT (IU/L)	14 ^{a, b} (10-19)	18 (14-25)	21 (15-30)	0,001
ALP (IU/L)	78 ^b (60-111)	72 ^c (51-108)	58 (50-68)	< 0,001
Ukupni proteini [#] (g/L)	66 ± 5 ^{a, b}	71 ± 5	72 ± 4	< 0,001
Albumin (g/L)	40 ^{a, b} (37-42)	42 ^c (40-43)	45 (43-47)	< 0,001

Podaci su prikazani kao [#]srednja vrednost ± standardna devijacija i poređeni analizom varijanse (ANOVA), ili kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Kruskal-Wallis testom; hsCRP – visoko-osetljivi C-reaktivni protein

^a - Statistički značajne razlike između ESRD i IDA grupe

^b - Statistički značajne razlike između ESRD i KG

^c - Statistički značajne razlike između IDA i KG

Statistički značajne razlike su utvrđene u pogledu vrednosti hsCRP, AST, ALT, ALP, ukupnih proteina i albumina. Grupa ESRD imala je statistički značajno više koncentracije ureje, kreatinina, mokraćne kiseline i hsCRP i značajno niže vrednosti AST, ALT, ukupnih proteina i albumina u odnosu na grupu IDA i KG. Vrednosti ALP su bile značajno više, a albumina značajno niže u grupi IDA u odnosu na KG.

Tabelarni prikaz hematoloških i parametara statusa gvožđa ispitivanih grupa dat je u Tabeli 18.

Tabela 18. Hematološki i parametri statusa gvožđa

Ispitivani parametri	ESRD (N = 126)	IDA (N = 31)	KG (N = 30)	P
WBC (10 ⁹ /L)	6,44 (5,55-7,80)	6,75 (5,66-8,45)	6,20 (5,30-7,01)	0,540
RBC (10 ¹² /L)	3,41 ^{a, b} (3,15-3,74)	4,23 (4,09-4,54)	4,72 (4,43-4,96)	< 0,001
Hemoglobin (g/L)	104,95 ^b (95,82-113,78)	103,00 ^c (97,30-111,70)	141,65 (129,33-151,15)	< 0,001
HCT (L/L)	0,32 ^b (0,29-0,35)	0,33 ^c (0,31-0,35)	0,42 (0,39-0,46)	< 0,001
MCV (fL)	93,88 ^{a, b} (91,00-97,16)	75,88 ^c (71,01-78,00)	88,9 (86,9-92,5)	< 0,001
MCH (pg)	30,5 ^a (29,6-31,5)	24,5 ^c (22,4-25,2)	29,5 (28,9-30,8)	< 0,001
MCHC (g/L)	323,2 ^{a, b} (318,8-328,0)	319,0 ^c (314,5-322,0)	333,6 (328,1-337,3)	< 0,001
RDW (%)	15,0 ^{a, b} (14,0-16,4)	17,1 ^c (15,7-18,1)	13,2 (12,6-13,7)	< 0,001
Serumsko gvožđe (µmol/L)	11,9 ^{a, b} (9,85-15,55)	6,00 ^c (3,90-9,90)	17,6 (14,3-20,1)	< 0,001
TIBC (µmol/L)	40,60 ^{a, b} (35,18-47,52)	69,50 ^c (62,60-73,30)	55,0 (50,7-60,6)	< 0,001
Transferin (g/L)	1,73 ^{a, b} (1,56-1,91)	3,18 ^c (2,87-3,30)	2,36 (2,18-2,61)	< 0,001
TSAT (%)	29,80 ^a (23,40-37,25)	8,40 ^c (5,30-14,60)	30,9 (24,4-38,3)	< 0,001
sTfR (mg/L)	1,25 ^a (0,93-1,64)	2,43 ^c (1,94-3,51)	1,19 (1,10-1,31)	< 0,001
Feritin (µg/L)	256,70 ^{a, b} (81,35-593,15)	8,00 ^c (8,00-8,50)	105,7 (29,6-171,3)	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Kruskal-Wallis testom; WBC – leukociti, RBC – eritrociti, HCT – hematokrit, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCH – prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – indeks anizocitoze, TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, sTfR – solubilni transferinski receptori

^a - Statistički značajne razlike između ESRD i IDA grupe

^b - Statistički značajne razlike između ESRD i KG

^c - Statistički značajne razlike između IDA i KG

Ispitivane grupe su se statistički značajno razlikovale u vrednostima RBC, Hgb, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW. Bolesnici u ESRD i IDA grupi su imali približno iste nivoe hemoglobina i HCT, koji su bili statistički značajno niži od vrednosti u KG. Vrednosti RBC su

bile značajno niže, a MCV značajno više u ESRD grupi u poređenju sa IDA i KG. Poređenjem sa ESRD i KG, parametri MCH i MCHC su bili značajno niži u IDA grupi. MCHC je bio značajno niži u ESRD u odnosu na KG. U pogledu vrednosti RDW, najviše vrednosti utvrđene u IDA grupi bile su značajno različite od vrednosti u ESRD i IDA grupi. Značajno više vrednosti RDW su utvrđene u ESRD u poređenju sa KG.

Prema parametrima statusa gvožđa utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih grupa prema vrednostima serumskog gvožđa, TIBC, transferina, TSAT, sTfR i feritina. Koncentracija serumskog gvožđa je bila značajno niža u ESRD i IDA grupi u odnosu na KG i značajno niža u IDA u poređenju sa ESRD grupom. Utvrđene su značajno niže vrednosti TIBC i transferina u ESRD grupi u odnosu na IDA i KG, i značajno niže vrednosti u KG u odnosu na IDA grupu. Ispitanici u IDA grupi su imali značajno niže vrednosti TSAT i značajno više vrednosti sTfR u poređenju sa ESRD i KG. Koncentracija feritina je bila značajno viša u ESRD grupi u poređenju sa IDA i KG, i značajno viša u KG u odnosu na IDA grupu.

U Tabeli 19 su prikazani novi hematološki parametri u ESRD, IDA i KG grupi ispitanika.

Tabela 19. Novi hematološki parametri

Ispitivani parametri	ESRD (N = 126)	IDA (N = 31)	KG (N = 30)	P
%HYPO (%)	1,9 ^{a, b} (0,7-4,5)	19,1 ^c (8,9-29,6)	0,2 (0,1-0,3)	< 0,001
LHD% (%)	12,4 ^{a, b} (8,1-18,1)	17,6 ^c (13,1-26,0)	4,9 (3,5-7,9)	< 0,001
Maf [#]	98,3 ± 14,7 ^{a, b}	78,1 ± 10,9 ^c	125,8 ± 13,2	< 0,001
RET (10 ⁹ /L)	48,6 (32,9–61,2)	42,5 (28,1-84,8)	44,4 (32,9–58,2)	0,772
IRF [#]	0,33 ± 0,09 ^b	0,38 ± 0,08 ^c	0,27 ± 0,05	0,004
CHr (pg)	32,0 ^a (31,0–33,4)	25,0 ^c (23,0-27,0)	32,9 (32,0-34,0)	< 0,001
RSf (fL) [#]	103,8 ± 6,1 ^{a, b}	89,2 ± 4,4 ^c	96,6 ± 5,8	< 0,001
MRV (fL) [#]	115,1 ± 9,3 ^{a, b}	105,6 ± 8,9	103,2 ± 9,6	< 0,001
MSCV (fL) [#]	89,6 ± 5,7 ^a	76,4 ± 4,9 ^c	86,6 ± 4,6	< 0,001
HLR (%)	0,46 ^b (0,28-0,67)	0,34 (0,22-0,68)	0,27 (0,16-0,34)	0,007

Podaci su prikazani kao [#]srednja vrednost ± standardna devijacija i poređeni analizom varijanse (ANOVA), ili kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Kruskal-Wallis testom; %HYPO - % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu, MRV – prosečna zapremina retikulocita

^a - Statistički značajne razlike između ESRD i IDA grupe

^b - Statistički značajne razlike između ESRD i KG

^c - Statistički značajne razlike između IDA i KG

Sa aspekta novih hematoloških parametara utvrđene su statistički značajne razlike u vrednostima %HYPO, LHD%, Maf, IRF, CHr, RSf, MRV, MSCV i HLR. Vrednosti parametara %HYPO i LHD% bile značajno više u IDA grupi u poređenju sa ESRD i KG, i značajno više u ESRD u odnosu na KG. Parametar Maf je bio značajno niži u ESRD i IDA grupi u poređenju sa KG, i značajno viši u ESRD u odnosu na IDA grupu. U pogledu IRF, značajno više vrednosti su utvrđene u ESRD i IDA grupi u poređenju sa KG, dok se grupe ESRD i IDA nisu značajno razlikovale. Utvrđene su značajno više vrednosti CHr u ESRD i KG u poređenju sa IDA, dok se ESRD i KG nisu značajno razlikovale. Parametar RSf je bio značajno viši u ESRD grupi u poređenju sa IDA i KG, i značajno viši u KG u odnosu na IDA

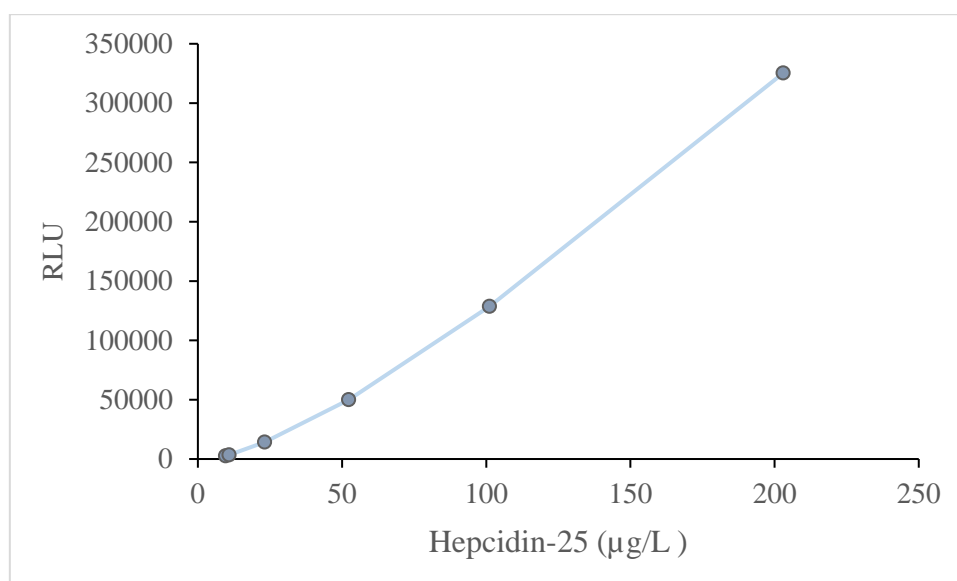
grupu. Značajno više vrednosti MRV su utvrđene u ESRD u poređenju sa grupom IDA i KG, dok su vrednosti MSCV bile značajno niže u IDA u poređenju sa ESRD i KG. Vrednosti HLR su bile značajno više u ESRD grupi u poređenju sa KG.

4.3. Analitička validacija testa za određivanje koncentracije hepcidina-25

Analitičke karakteristike testa za određivanje koncentracije hepcidina-25, opisane u poglavlju Materijal i metode, ispitane su određivanjem granice detekcije, linearnosti i nepreciznosti u seriji i iz dana u dan.

Izrada standardne krive

Standardna kriva zavisnosti koncentracije hepcidina-25 i intenziteta hemiluminiscencije (*eng. Relative Light Units, RLU*) je pripremana uz svako izvođenje analize prema uputstvu proizvođača navedenom u Tabeli 3 poglavlja Materijal i metode. Primer standardne krive predstavljen je na Slici 18. Koeficijent varijacije svake tačke standardne krive čija je koncentracija veća od 20 µg/L bio je manji od 20% (Tabela 21); izračunate vrednosti kontrolnih uzoraka bile su u okviru opsega određenih od strane proizvođača i naznačenih na nalepnicama kontrolnih uzoraka i vrednost RLU slepe probe reagensa je bila manja od RLU vrednosti za Kalibrator 6. Sve navedeno je potvrdilo ispunjenost zahteva unutrašnje kontrole kvaliteta i ukazalo na pouzdanost određenih koncentracija hepcidina-25.



Slika 18. Standardna kriva zavisnosti koncentracije hepcidina-25 i intenziteta hemiluminiscencije (RLU)

U Tabeli 20 prikazane su karakteristike kalibracione krive sa Slike 18.

Tabela 20. Karakteristike kalibracione krive

MSE	2,78029e + 006
R ²	0,9998
SS	1,66817e + 007
SYX	2888,06
a	-1915,61
b	1,45241
c	708,462
d	2,33538e + 006

MSE – srednja kvadratna greška (*eng. mean square error*), SS – suma kvadrata (*eng. sum of squares*), SYX – standardna greška (*eng. standard error of estimate*), a – minimalna vrednost koja se može odrediti, b – Hill-ov nagib krive (stepen nagiba krive u tački c), c – tačka pregiba (tj. tačka krive na polovini puta između a i d), d – maksimalna vrednost koja se može odrediti

Koncentracija hepcidina-25 (zavisna varijabla – y) je izračunata prema jednačini:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

Nakon izrade standardne krive upoređene su očekivane i dobijene koncentracije hepcidina-25, tj. izračunat % odstupanja. Tabelarni prikaz dobijenih rezultata dat je u Tabeli 21.

Tabela 21. Odnos očekivane i dobijene koncentracije hepcidina-25

Kalibrator	Očekivana koncentracija	Dobijena koncentracija	RLU korigovana za vrednost slepe probe	% odstupanja
Standard 1	6,40	9,64	2630	50,7
Standard 2	12,70	10,84	3469	-14,7
Standard 3	25,40	23,16	14231	-8,8
Standard 4	50,75	52,33	50025	3,1
Standard 5	101,50	101,14	128676	-0,4
Standard 6	203,0	203,03	325346	0,0

RLU- intenzitet hemiluminiscencije

Granica detekcije

Granica detekcije korišćenog testa je određena analiziranjem destilovane vode 10 puta i izračunavanjem zbira srednje vrednosti i tri standardne devijacije. Određena vrednost granice detekcije iznosi 7,93 µg/L.

Imajući u vidu da je granica detekcije za hepcidin-25 određena od strane proizvođača reagensa prema CLSI EP17-A protokolu iznosila 7,84 µg/L, može se zaključiti da test zadovoljava karakteristike u pogledu osetljivosti, a koje su prikazane od strane proizvođača.

Linearnost

Linearnost Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA testa je ispitana serijskim razblaženjem uzorka visoke koncentracije. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Rezultati odstupanja koncentracije hepcidina-25

Stepen razblaženja	Dobijena vrednost (µg/L)	Očekivana vrednost (µg/L)	Razlika (Dobijena – očekivana vrednost)
100%	246,5	246,5	100%
50%	122,2	123,2	99%
25%	65,8	61,6	106%
12,5%	31,4	30,8	98%
6,25%	12,0	15,4	72%
3,125%	8,1	7,7	105%

Rezultati našeg ispitivanja linearnosti su pokazali da su dobijena odstupanja u odnosu na očekivanu koncentraciju hepcidina-25 bile < 7% za interval koncentracija 15,4 – 246,5 µg/L i za koncentraciju 7,7 µg/L. Uočeno je odstupanje od 28% pri koncentraciji 15,4 µg/L. Veće odstupanje na nižim koncentracijama se može smatrati prihvatljivim imajući u vidu veće dozvoljene varijacije kod koncentracija ispod 20 µg/L pri izradi standardne krive i podatke od proizvođača za nepreciznost kod niskih koncentracija (Tabela 10 poglavlja Materijal i metode). Iz svega navedenog može se zaključiti da su naši rezultati prihvatljivi i u skladu sa podacima proizvođača za linearnost, a koja je određena prema CLSI EP6-A protokolu (Tabela 9 poglavlja Materijal i metode).

Nepreciznost

U cilju provjere pouzdanosti korišćenog Corgenix Hepcidin-25 Chemiluminescent ELISA testa ispitana je nepreciznosti u seriji i nepreciznost iz dana u dan. Nepreciznost u seriji je ispitana 10 puta ponovljenim određivanjem uzorka u jednoj seriji. Za određivanje nepreciznosti iz dana u dan korišćen je kontrolni uzorak, a analiziranje je ponavljano tokom 5 dana. Izračunati statistički parametri ispitivanja nepreciznosti prikazani su u Tabeli 23.

Tabela 23. Nepreciznost metode za određivanje hepcidina-25

	Xsr (µg/L)	Sd	Kv (%)
Nepreciznost u seriji	259,5	20,8	8,0
Nepreciznost iz dana u dan	48,5	8,63	17,8

Prema podacima proizvođača koeficijenti varijacije kretali su se u intervalu od 5,4 – 22,0% u seriji i 11,5 – 23,2% iz dana u dan (Tabela 9 poglavlja Materijal i metode).

Vrednosti statističkih parametara prikazanih u Tabeli 23 ukazuju da je nepreciznost u seriji i iz dana u dan bila u skladu sa rezultatima proizvođača, tj. da se određivanje koncentracije hepcidina-25 može smatrati pouzdanim za ostvarenje ciljeva ovog istraživanja.

4.4. Koncentracija hepcidina-25

Tabela 24 prikazuje koncentraciju hepcidina-25 u ESRD, IDA i KG grupi ispitanika.

Tabela 24. Koncentracija hepcidina-25 u ispitivanim grupama

Hepcidin-25 (µg/L)	ESRD	IDA	KG	P
ME	53,98 ^{a, b}	3,00 ^c	8,69	< 0,001
(IO)	(18,82–110,51)	(2,74–3,05)	(3,89–15,22)	
Min	3,00	2,52	3,00	
Max	299,31	9,19	30,92	

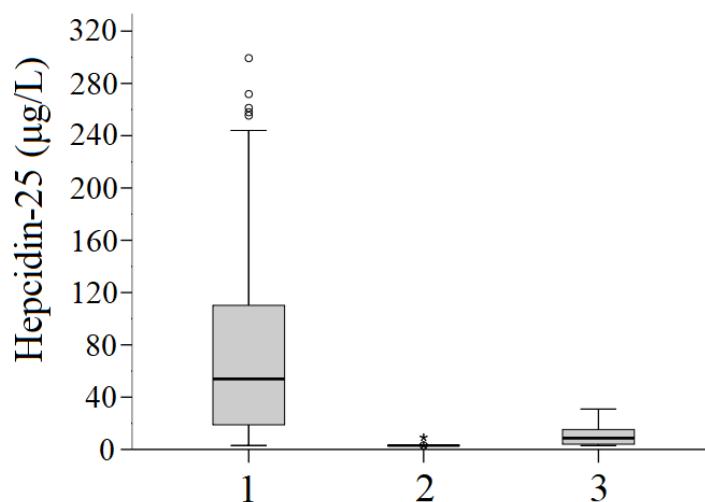
Podaci su prikazani kao medijana (ME) sa interkvartilnim opsegom (IO) i poređeni Kruskal-Wallis testom; Min-najniža koncentracija, Max-najviša koncentracija

^a - Statistički značajne razlike između ESRD i IDA grupe

^b - Statistički značajne razlike između ESRD i KG

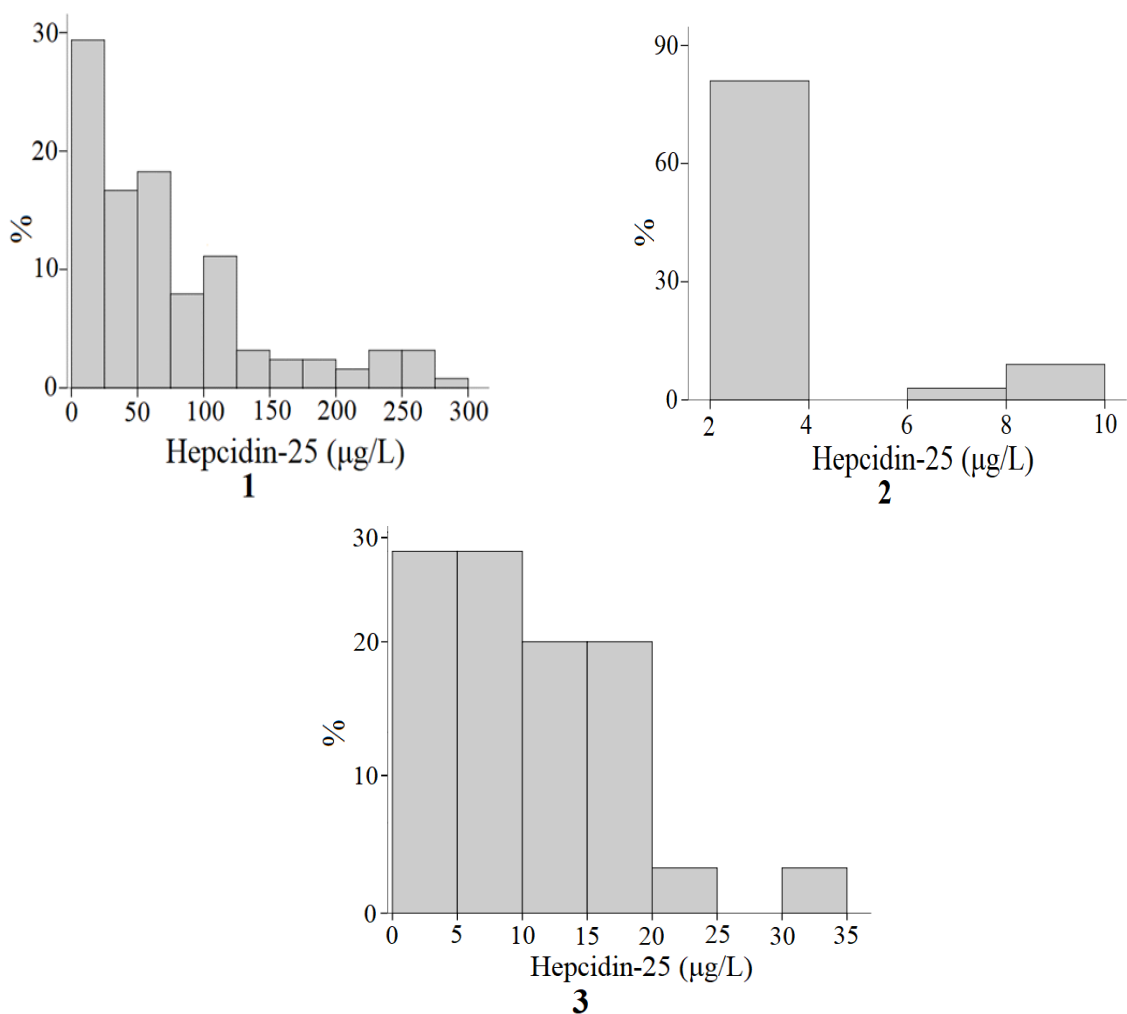
^c - Statistički značajne razlike između IDA i KG

Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji hepcidina-25 između ispitivanih grupa. Bolesnici u ESRD grupi imali su oko 18 puta više koncentracije hepcidina-25 u odnosu na IDA grupu. Koncentracija hepcidina-25 u ESRD grupi bila je oko 6 puta viša u odnosu na KG i oko 3 puta viša u KG u poređenju sa IDA grupom. Najniža izmerena koncentracija hepcidina-25 u ESRD grupi bila je 3,00 $\mu\text{g/L}$, a najviša 299,31 $\mu\text{g/L}$. Koncentracija hepcidina-25 u ispitivanim grupama prikazana je na Slici 19.



Slika 19. Box plot prikazuje najnižu vrednost, prvi kvartil, medijanu, treći kvartil i najvišu vrednost koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti (1), pacijenata sa sideropenijskom anemijom (2) i kontrolnoj grupi (3)

Raspodela koncentracije hepcidina-25 u grupi ESRD, IDA i KG prikazana je na Slici 20.



Slika 20. Raspodela (relativna frekvencija, %) koncentracije hepcidina-25 u grupi bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti (1), pacijenata sa sideropenijskom anemijom (2) i kontrolnoj grupi (3) ispitanika.

Najviša učestalost koncentracije hepcidina-25 u ESRD grupi utvrđena je u opsegu od 3 – 25 µg/L (29,4%), zatim u opsegu od 25 – 75 µg/L (35%) i od 75 – 125 µg/L (18,9%). U IDA grupi najveći procenat ispitanika je imao koncentraciju hepcidina-25 u opsegu od 2,52 – 4 µg/L (87,1%), dok su ispitanici u KG imali najvišu zastupljenost koncentracije u intervalu od 3 – 10 µg/L (53,4%) i od 10 do 20 µg/L (40%) (Slika 20).

U Tabeli 25 dat je prikaz koncentracije hepcidina-25 u ESRD-D i ESRD-PD grupi.

Tabela 25. Koncentracija hepcidina-25 u ESRD-D i ESRD-PD grupi

Hepcidin-25 (µg/L)	ESRD-D	ESRD-PD	<i>P</i>
ME	53,01	59,26	0,645
(IO)	(15,08-100,91)	(36,52-124,27)	
Min	3,00	3,00	
Max	271,83	299,31	

Podaci su prikazani kao medijana (ME) sa interkvartilnim opsegom (IO) i poređeni Mann–Whitney *U* testom, Min-najniža koncentracija, Max-najviša koncentracija; ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijalizom, ESRD-PD – grupa predijaliznih bolesnika

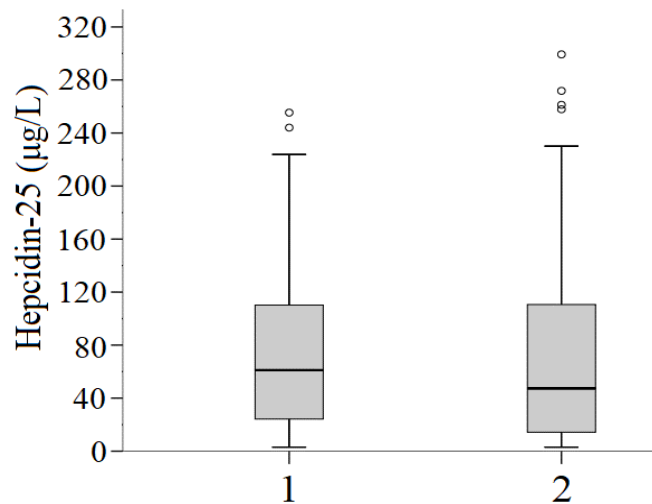
Utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno razlikovala između ESRD-D i ESRD-PD grupe. U Tabeli 26 je prikazana koncentracija hepcidina-25 kod muškaraca i žena u ESRD grupi.

Tabela 26. Koncentracija hepcidina-25 kod muškaraca i žena u ESRD grupi

Hepcidin-25 (µg/L)	Muškarci	Žene	<i>P</i>
ME	47,37	61,13	0,380
(IO)	(13,93-110,90)	(22,94-110,62)	
Min	3,00	3,00	
Max	299,31	255,39	

Podaci su prikazani kao medijana (ME) sa interkvartilnim opsegom (IO) i poređeni Mann–Whitney *U* testom, Min-najniža koncentracija, Max-najviša koncentracija

Poređenjem koncentracije hepcidina-25 kod ESRD bolesnika muškog i ženskog pola utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike. Koncentracija hepcidina-25 kod žena i muškaraca u ESRD grupi prikazana je na Slici 21.



Slika 21. Box plot prikazuje najnižu vrednost, prvi kvartil, medijanu, treći kvartil i najvišu vrednost koncentracije hepcidina-25 kod žena (1) i muškaraca (2) u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti

4.5. Zastupljenost varijanti u genu *TMPRSS6* i *HFE*

Za ispitivanje uticaja genetskih faktora na sintezu hepcidina-25, određivanjem zastupljenosti genetskih varijanti dva gena: *TMPRSS6* (A736V) i *HFE* (C282Y i H63D) korišćena je grupa sačinjena od 126 bolesnika u ESRD, 31 ispitanica u IDA i 30 zdravih osoba KG.

Tabelarni prikaz zastupljenosti varijante A736V u genu *TMPRSS6* i varijanti C282Y i H63D u genu *HFE* u ESRD, IDA i KG prikazan je u Tabeli 27.

Tabela 27. Zastupljenost varijanti u genu *TMPRSS6* i *HFE*

Genotip/alel	ESRD (N = 126)	IDA (N = 31)	KG (N = 30)	P
<i>TMPRSS6</i> A736V				
A/A	18,3	22,6	13,3	0,852
A/G	47,6	45,2	56,7	
G/G	34,1	32,3	30,0	
A alel	42,0	45,0	42,0	0,223
H-W (<i>Chi square, P</i>)	0,07 (0,796)	0,241 (0,623)	0,567 (0,803)	
<i>HFE</i> H63D				
C/C	78,6	87,1	70,0	0,266
C/G	21,4	12,9	30,0	
G/G	0	0	0	
G alel	10,7	6,4	15,0	0,199
H-W (<i>Chi square, P</i>)	1,808 (0,405)	0,147 (0,928)	0,170 (0,680)	
<i>HFE</i> C282Y				
G/G	95,2	93,5	96,7	0,850
G/A	4,8	6,5	3,3	
A/A	0	0	0	
A alel	2,4	3,2	1,6	0,667
H-W (<i>Chi square, P</i>)	0,076 (0,962)	0,035 (0,982)	0,011 (0,915)	
<i>HFE</i> haplotipovi				
wt/wt	0,74	0,81	0,67	0,592
C282Y/wt	0,05	0,06	0,03	
H63D/wt	0,21	0,13	0,30	

H-W - Hardy–Weinbergova ravnoteža; rezultati su prikazani u procentima (%)

Učestalost genskih varijanti *TMPRSS6* A736V, *HFE* C282Y i *HFE* H63D, kao i *HFE* haplotipova nije se statistički značajno razlikovala između grupe ESRD, IDA i KG (Tabela 27). Frekvencije *TMPRSS6* A736V genotipova i alela u ispitivanim grupama bile su u Hardy–Weinbergovoj ravnoteži. Retka homozigotna varijanta G/G za *HFE* H63D i A/A za *HFE* C282Y nije detektovana u ispitivanim grupama.

Ako se uzme u obzir da je prevalenca ESRD kod odraslih u Srbiji 0,07%, post hoc power analiza pokazala je da 126 bolesnika u ESRD i 31 ispitanica u IDA grupi imaju snagu za identifikaciju asocijacije (log-aditivni model nasleđivanja) od 66% za *TMPRSS6* A736V, 27% za *HFE* H63D i 17% za *HFE* C282Y varijantu gena.

4.6. Hematološki parametri, parametri statusa gvožđa i inflamacije u grupi ESRD-D i ESRD-PD

ESRD grupa je podeljena na osnovu lečenja hemodijaliznim tretmanom na ESRD-D i ESRD-PD grupu i analizirane su razlike. U Tabeli 28 dat je uporedni prikaz kompletne krvne slike bolesnika ESRD-D i ESRD-PD grupe.

Tabela 28. Parametri kompletne krvne slike

Ispitivani parametri	ESRD-D (N = 103)	ESRD-PD (N = 23)	P
WBC ($10^9/L$)	6,38 (5,53-7,72)	7,26 (5,96-8,07)	0,225
Neutrofili ($10^9/L$)	3,98 (3,10-5,24)	4,21 (3,72-4,75)	0,432
Limfociti ($10^9/L$)	1,43 (1,22-1,73)	1,70 (1,45-2,03)	0,038
Monociti ($10^9/L$)	0,60 (0,51-0,73)	0,48 (0,39-0,66)	0,009
Eozinofili ($10^9/L$)	0,20 (0,14-0,31)	0,20 (0,10-0,30)	0,110
Bazofili ($10^9/L$)	0,00 (0,00-0,02)	0,00 (0,00-0,00)	0,148
RBC ($10^{12}/L$)	3,41 (3,18-3,73)	3,36 (3,02-3,75)	0,544
Hemoglobin (g/L)	105,0 (96,5-113,7)	101,8 (93,9-114,3)	0,631
HCT (L/L)	0,33 (0,30-0,35)	0,31 (0,28-0,34)	0,099
MCV (fL)	94,4 (92,4-97,6)	90,8 (88,0-93,4)	< 0,001
MCH (pg)	30,6 (29,6-31,5)	30,4 (29,4-30,9)	0,618
MCHC (g/L)	322 (317,5-325,6)	334,4 (328,8-340,1)	< 0,001
RDW (%)	15,2 (14,1-16,5)	14,4 (13,3-15,3)	0,003
PLT ($10^9/L$)	177 (152-219)	198 (155-238)	0,406
MPV (fL)	9,2 (8,5-9,9)	9,4 (8,9-10,0)	0,729
PDW (%)	43,1 (39,9-48,4)	47,5 (45,5-53,8)	0,877

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; WBC – leukociti, RBC – eritrociti, HCT – hematokrit, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCH – prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – indeks anizocitoze, PLT – trombociti, MPV – prosečna zapremina trombocita, PDW – koeficijent varijacije zapremine trombocita

Utvrđene su statistički značajne razlike između ESRD-D i ESRD-PD grupe prema apsolutnom broju limfocita, monocita, i indeksima MCV, MCHC i RDW. Značajno više vrednosti Mo, MCV i RDW, i značajno niže vrednosti Ly i MCHC su uočene u ESRD-D grupi u odnosu na ESRD-PD.

Tabelarni prikaz parametara statusa gvožđa i inflamacije u ESRD-D i ESRD-PD grupi dat je u Tabeli 29.

Tabela 29. Parametri statusa gvožđa i inflamacije

Ispitivani parametri	ESRD-D (N = 103)	ESRD-PD (N = 23)	P
Serumsko gvožđe (µmol/L)	12,1 (9,7-15,5)	11,2 (10,1-15,8)	0,613
TIBC (µmol/L)	38,5 (34,4-45,2)	47,2 (42,4-51,9)	< 0,001
Transferin (g/L)	1,65 (1,54-1,84)	1,91 (1,76-2,13)	< 0,001
TSAT (%)	30,4 (24,4-38,4)	26,7 (20,9-34,2)	0,142
sTfR (mg/L)	1,22 (0,89-1,57)	1,36 (1,03-1,81)	0,169
Feritin (µg/L)	316,7 (81,8-661,2)	129,0 (79,1-251,8)	0,024
sTfR/log feritin	0,50 (0,37-0,70)	0,67 (0,54-0,87)	0,026
hsCRP (mg/L)	2,7 (1,5-7,8)	2,5 (0,9-9,2)	0,538

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, ESRD-PD – grupa predijaliznih bolesnika, TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, TSAT – saturacija transferina, sTfR – solubilni transferinski receptori, hsCRP – visoko-osetljivi C-reaktivni protein

U pogledu parametara statusa gvožđa i inflamacije grupe ESRD-D i ESRD-PD su se statistički značajno razlikovale prema vrednostima TIBC, transferina, feritina i indeksa sTfR/log feritin. Utvrđene su značajno više vrednosti feritina i značajno niže vrednosti TIBC, transferina i indeksa sTfR/log feritin u ESRD-D u poređenju sa ESRD-PD grupom.

Tabelarni prikaz novih hematoloških parametara u ESRD-D i ESRD-PD grupi dat je u Tabeli 30.

Tabela 30. Novi hematološki parametri

Ispitivani parametri	ESRD-D (N = 103)	ESRD-PD (N = 23)	P
%HYPO (%)	2,4 (0,9-4,8)	0,7 (0,4-1,3)	< 0,001
LHD% (%)	13,68 (9,94-20,3)	4,52 (2,71-7,47)	< 0,001
Maf	99,8 (89,3-109,2)	96,0 (85,0-103,7)	0,112
RET (10 ⁹ /L)	49,6 (36,0-63,5)	40,8 (25,6-59,2)	0,207
IRF	0,336 (0,284-0,403)	0,245 (0,205-0,305)	< 0,001
CHr (pg)	32,0 (31,0-34,0)	33,0 (31,0-33,0)	0,831
RSf (fL)	105,0 (101,0-108,3)	100,4 (96,0-104,7)	0,001
MRV (fL)	116,0 (109,2-122,4)	110,9 (103,7-117,5)	0,010
MSCV (fL)	89,5 (86,0-93,9)	89,1 (84,4-91,7)	0,242
HLR (%)	0,50 (0,30-0,72)	0,29 (0,21-0,54)	0,011

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom, ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, ESRD-PD – grupa predijaliznih bolesnika, %HYPO – % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu, MRV – prosečna zapremina retikulocita

Sa aspekta novih hematoloških parametara ESRD-D i ESRD-PD grupe su se statistički značajno razlikovale prema %HYPO, LHD%, IRF, RSf, MRV i HLR. Utvrđene su značajno više vrednosti navedenih parametara u ESRD-D u poređenju sa ESRD-PD grupom.

4.7. Analiza anemije u grupi ESRD bolesnika

U cilju analize prisustva anemije grupa ESRD bolesnika je podeljena na osnovu koncentracije hemoglobina na grupu sa anemijom (Hgb < 110 g/L, ESRD-A) i grupu bez anemije (Hgb ≥ 110 g/L, ESRD-NA). Analizom nije obuhvaćeno 7 bolesnika kod kojih je

vrednost hsCRP bila viša od 50 mg/L. Prikaz osnovnih hematoloških parametara dat je u Tabeli 31.

Tabela 31. Osnovni hematološki parametri

Ispitivani parametri	ESRD-A (N = 80)	ESRD-NA (N = 39)	P
WBC ($10^9/L$)	6,29 (5,21-7,39)	6,52 (5,88-8,37)	0,090
RBC ($10^{12}/L$)	3,31 (3,01-3,49)	3,95 (3,75-4,55)	< 0,001
HCT (L/L)	0,31 (0,29-0,33)	0,37 (0,35-0,41)	< 0,001
MCV (fL)	94,1 (92,4-97,3)	93,6 (89,6-96,8)	0,276
MCH (pg)	30,6 (29,9-31,6)	30,4 (29,1-31,1)	0,117
MCHC (g/L)	323,6 (320,2-328,4)	322,3 (316,8-326,9)	0,217
RDW (%)	15,2 (14,0-16,4)	15,0 (13,8-16,2)	0,386

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; WBC – leukociti, RBC – eritrociti, HCT – hematokrit, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCH – prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – indeks anizocitoze

Tabelarni prikaz parametara statusa gvožđa i inflamacije u ESRD-A i ESRD-NA grupi dat je u Tabeli 32.

Tabela 32. Parametri statusa gvožđa i inflamacije

Ispitivani parametri	ESRD-A (N = 80)	ESRD-NA (N = 39)	P
Hepcidin-25 (µg/L)	55,28 (31,21-105,37)	33,86 (10,01-83,33)	0,039
Serumsko gvožđe (µmol/L)	12,0 (10,0-16,3)	12,8 (10,0-14,7)	0,665
TIBC (µmol/L)	40,1 (34,3-47,5)	43,8 (36,9-50,6)	0,048
Transferin (g/L)	1,69 (1,52-1,92)	1,78 (1,59-1,94)	0,128
TSAT (%)	31,2 (24,7-39,5)	27,5 (21,7-33,5)	0,059
sTfR (mg/L)	1,18 (0,86-1,46)	1,55 (1,16-1,84)	0,001
Feritin (µg/L)	256,7 (98,7-660,8)	137,2 (58,2-355,4)	0,020
sTfR/log feritin	0,50 (0,37-0,65)	0,74 (0,49-0,89)	< 0,001
hsCRP (mg/L)	2,5 (1,3-6,5)	3,0 (1,5-6,7)	0,465

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, TSAT – saturacija transferina, sTfR – solubilni transferinski receptori, hsCRP – visoko-senzitivni C-reaktivni protein

Utvrđena je statistički značajna razlika između grupa ESRD-A i ESRD-NA prema vrednostima RBC, HCT, hepcidina-25, TIBC, sTfR, feritina i indeksa sTfR/log feritin. Bolesnici u ESRD-A grupi su imali značajno više vrednosti hepcidina-25 i feritina, i značajno niže vrednosti RBC, HCT, TIBC, sTfR i indeksa sTfR/log feritin u poređenju sa grupom ESRD-NA. Primenom ANCOVA testa da bi se eliminisao uticaj pola i starosti utvrđeno je da je razlika između ESRD-A i ESRD-NA grupe, za navedene parametre, zadržala statističku značajnost. Nakon uklanjanja uticaja koncentracije feritina, utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije značajno razlikovala između ESRD-A i ESRD-NA grupe.

U Tabeli 33 je dat prikaz novih hematoloških parametara u ESRD-A i ESRD-NA grupi i analizirane razlike.

Tabela 33. Novi hematološki parametri

Ispitivani parametri	ESRD-A (N = 80)	ESRD-NA (N = 39)	P
%HYPO (%)	2,0 (0,7-4,9)	1,7 (0,6-4,2)	0,248
LHD% (%)	12,1 (7,9-16,0)	13,3 (8,9-21,5)	0,217
Maf	94,2 (85,6-100,6)	113,7 (107,0-121,1)	< 0,001
RET (10 ⁹ /L)	49,3 (32,4-60,7)	48,1 (36,1-64,4)	0,469
IRF	0,320 (0,249-0,379)	0,336 (0,292-0,426)	0,199
CHr (pg)	32,4 (31,0-33,4)	32,0 (31,0-33,0)	0,491
RSf (fL)	104,2 (99,9-107,9)	104,6 (100,2-108,6)	0,962
MRV (fL)	114,4 (108,9-120,4)	116,9 (108,5-122,7)	0,666
MSCV (fL)	88,6 (85,6-93,1)	91,1 (85,6-93,5)	0,918
HLR (%)	0,485 (0,268-0,727)	0,429 (0,287-0,598)	0,393

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom, ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, ESRD-PD – grupa predijaliznih bolesnika, %HYPO – % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu, MRV – prosečna zapremina retikulocita

Utvrđena je statistički značajna razlika prema vrednosti Maf. Grupa ESRD-NA je imala značajno više vrednosti Maf u poređenju sa ESRD-A grupom.

4.8. Analiza anemije hronične bolesti primenom Thomasovog algoritma

U cilju ispitivanja deficita gvožđa kod anemije hronične bolesti, ESRD-A grupa je klasifikovana na osnovu Thomasovog algoritma. Tabelarni prikaz rezultata klasifikacije bolesnika ESRD-A prema Thomasovom algoritmu, koncentracije hepcidina-25, CHr i sTfR/log feritin u navedenim kvadrantima date su u Tabeli 34.

Tabela 34. Klasifikacija ESRD-A bolesnika primenom Thomasovog algoritma

Kvadrant	Opis kvadranta	N	sTfR/log ferritin	CHr (pg)	Hepcidin-25 (µg/L)
1.	Hipoproliferativna eritropoeza Dovoljan depo gvožđa	72	0,45 (0,37-0,58)	33,0 (32,0-34,0)	56,02 (32,78-109,15)
2.	Latentni nedostatak gvožđa Smanjen depo gvožđa	3	1,68 (1,60-/-)	31,9 (31,0-/-)	3,00 (3,00-/-)
3.	Smanjen depo i funkcionalno gvožđe	3	2,05 (1,03-/-)	27,0 (26,0-/-)	12,75 (11,97-/-)
4.	Deficit funkcionalnog, Dovoljno telesnog gvožđa	2	0,63 (0,42-/-)	28,0 (24,0-/-)	59,38 (36,37-/-)

Podaci su predstavljeni kao N – broj bolesnika i medijana sa interkvartilnim opsegom (za preko 3 ispitanika), sTfR – solubilni transferinski receptor, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu

Anemija hronične bolesti (*eng. Anemia of chronic disease, ACD*) bez deficita gvožđa je utvrđena kod 72 bolesnika ESRD-A grupe, dok je deficit gvožđa (*eng. Iron deficiency, ID*) bio prisutan kod 8 bolesnika. Od 72 bolesnika sa ACD, 42 (58%) su bila na terapiji *i.v.* gvoždem, dok je od 8 bolesnika sa ID dvoje (25%) bilo na terapiji *i.v.* gvoždem. Klasifikacija bolesnika sa ACD i ACD-ID prema primeni ESAs i *i.v.* gvožđa data je u Tabeli 35.

Tabela 35. Uticaj terapije na primenu Thomasovog algoritma kod ESRD-A bolesnika

Grupa	Primena ESAs	Primena <i>i.v.</i> gvožđa	N	Hgb (g/L)	TSAT (%)	Feritin (µg/L)
ACD	Bez terapije	Bez terapije	17	99,3 (89,8-105,3)	32,4 (24,6-38,9)	96,6 (56,9-229,8)
		Na terapiji	5	101,7 (74,5-106,7)	26,2 (16,3-34,1)	124,5 (51,5-257,6)
	Na terapiji	Bez terapije	13	100,3 (89,5-105,0)	33,3 (24,4-40,8)	582,3 (268,6-961,5)
		Na terapiji	37	102,8 (96,0-107,0)	33,1 (27,8-44,9)	522,9 (174,4-707,8)
ACD – ID	Bez terapije	Bez terapije	3	98,3 (90,7-/-)	20,9 (19,4 -/-)	46,5 (17,4-/-)
		Na terapiji	1	91,0 (91,0-/-)	16,0 (16,0-/-)	68,7 (68,7-/-)
	Na terapiji	Bez terapije	3	98,4 (89,1-/-)	24,8 (24,8-/-)	168,3 (168,3-/-)
		Na terapiji	1	94,8 (94,8-/-)	31,5 (31,5-/-)	295,7 (295,7-/-)

Podaci su predstavljeni kao N – broj bolesnika i medijana sa interkvartilnim opsegom (za preko 3 ispitanika), ESAs – agensi stimulacije eritropoeze, *i.v.* – intravenski, ACD – anemija hronične bolesti, ID – deficit gvožđa

Bolesnici sa ACD na terapiji ESAs su imali adekvatno popunjene depoe gvožđa i TSAT (Tabela 35). Jedan bolesnik u ACD-ID grupi na terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem ima funkcionalni deficit gvožđa, tj. adekvatno popunjene depoe i TSAT uz neodgovarajući efekat terapije, dok je ostalih 7 imalo nedovoljno popunjene depoe uz TSAT < 30%.

U cilju ispitivanja deficita gvožđa kod anemije hronične bolesti analizirali smo i grupu predijaliznih bolesnika (ESRD-PD) Thomasovim algoritmom (Tabela 36). Ova grupa bolesnika nije bila na terapiji anemije ni ESAs ni *i.v.* gvoždem. Od ukupno 23 bolesnika ESRD-PD grupe 13 je imalo koncentraciju Hgb nižu od 110 g/L. ACD bez deficita gvožđa (I kvadrant) je imalo 10, a latentni deficit gvožđa (kvadrant II) 3 bolesnika ESRD-PD grupe (Tabela 36 i 37).

Tabela 36. Klasifikacija ESRD-PD bolesnika primenom Thomasovog algoritma

Kvadrant	Opis kvadranta	N	sTfR/log feritin	CHr (pg)	Hepcidin-25 (µg/L)
1.	Hipoproliferativna eritropoeza Dovoljan depo gvožđa	10	0,58 (0,51-0,68)	33,0 (32,0-34,0)	66,97 (36,10-110,33)
2.	Latentni nedostatak gvožđa Smanjene rezerve gvožđa	3	1,67 (1,64-/-)	31,9 (31,0-/-)	3,00 (3,00-/-)
3.	Smanjen depo i funkcionalno gvožđe	/	/	/	/
4.	Deficit funkcionalnog, Dovoljno telesnog gvožđa	/	/	/	/

Podaci su predstavljeni kao N – broj bolesnika i medijana sa interkvartilnim opsegom (za preko 3 ispitanika), sTfR – solubilni transferinski receptor, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu

Tabela 37. Uticaj terapije na primenu Thomasovog algoritma kod ESRD-PD bolesnika

Grupa	Primena ESAs	Primena <i>i.v.</i> gvožđa	N	Hgb (g/L)	TSAT (%)	Feritin (µg/L)
ACD	Bez terapije	Bez terapije	10	98,7 (90,1-106,4)	25,8 (23,2-36,9)	105,5 (60,8-223,2)
ACD – ID	Bez terapije	Bez terapije	3	98,3 (90,7-/-)	20,9 (19,4-/-)	46,5 (17,4-/-)

Podaci su predstavljeni kao N – broj bolesnika i medijana sa interkvartilnim opsegom (za preko 3 ispitanika), ESAs – agensi stimulacije eritropoeze, *i.v.* – intravenski, ACD – anemija hronične bolesti, ID – deficit gvožđa

4.9. Analiza uticaja terapije anemije sa ESAs i *i.v.* gvoždem

Za ispitivanje uticaja terapije anemije na koncentraciju hepcidina-25 korišćena je grupa bolesnika lečenih hroničnim programom HD – ESRD-D grupa. Na osnovu primenjene terapije ESAs i *i.v.* gvožđa od 103 bolesnika ESRD-D grupe formirane su 4 podgrupe.

- Grupa 1, koju je činilo 19 bolesnika koji su lečeni ESAs
- Grupa 2, koja se sastojala od 45 bolesnika lečenih ESAs i *i.v.* gvoždem
- Grupa 3, koju je činilo 22 bolesnika koji su bili na terapiji *i.v.* gvoždem i
- Grupa 4, koja se sastojala od 17 bolesnika koji nisu bili na terapiji ESAs ni *i.v.* gvoždem

U Tabeli 38 prikazani su osnovni hematološki parametri, u Tabeli 39 parametri statusa gvožđa i inflamacije i u Tabeli 40 novi hematološki parametri grupa 1, 2, 3 i 4.

Tabela 38. Osnovni hematološki parametri kod ESRD-D grupe bolesnika klasifikovanih prema terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem

Parametar	Grupa 1 (N = 19)	Grupa 2 (N = 45)	Grupa 3 (N = 22)	Grupa 4 (N = 17)	P
WBC (10 ⁹ /L)	5,97 (4,75-8,07)	6,35 (5,38-7,33)	6,98 (6,07-8,45)	6,11 (5,74-6,70)	0,134
RBC (10 ¹² /L)	3,31 (3,01-3,65)	3,38 (3,15-3,49) ##	3,85 (3,57-4,60)	3,68 (3,28-4,05)	< 0,001
Hgb (g/L)	100,5 (93,0-107,2) *	103,1 (96,0-107,5) **	118,0 (104,8-131,7)	112,6 (101,6-123,1)	< 0,001
HCT (L/L)	0,31 (0,29-0,33) *	0,32 (0,30-0,33) **	0,37 (0,33-0,41)	0,36 (0,31-0,39)	< 0,001
MCV (fL)	95,3 (89,5-100,9)	94,8 (92,7-97,6)	94,1 (89,8-97,7)	93,1 (91,0-97,2)	0,476
MCH (pg)	31,0 (28,9-32,2)	30,6 (30,0-31,6)	29,9 (28,4-31,5)	30,1 (29,4-31,2)	0,307
MCHC (g/L)	322,3 (317,4-325,2)	321,9 (319,1-325,8)	321,5 (314,7-326,3)	319,6 (316,9-323,3)	0,390
RDW (%)	15,3 (13,9-16,4)	15,4 (14,4-16,6)	16,0 (14,2-16,8)	14,7 (13,7-15,3)	0,221

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajne razlike utvrđene Kruskal-Wallis testom: *Grupa 1 vs Grupa 3 i Grupa 1 vs Grupa 4, $P < 0,05$; **Grupa 2 vs Grupa 3 i Grupa 2 vs Grupa 4, $P < 0,05$; ## Grupa 4 vs Grupa 2 i Grupa 3 vs Grupa 2 i Grupa 3 vs Grupa 1, $P < 0,05$

Tabela 39. Parametri statusa gvožđa i inflamacije kod ESRD-D grupe bolesnika klasifikovanih prema terapiji ESAs i *i.v* gvožđem

Parametar	Grupa 1 (N = 19)	Grupa 2 (N = 45)	Grupa 3 (N = 22)	Grupa 4 (N = 17)	<i>P</i>
Hepcidin-25 (µg/L)	50,07 (24,20-128,61) *	59,76 (39,94-98,91) **	22,60 (9,16-80,33)	16,36 (7,98-57,46)	0,011
Serumsko gvožđe (µmol/L)	10,8 (10,0-16,4)	11,70 (9,60-15,75)	10,40 (7,03-13,78)	13,2 (11,5-15,6)	0,076
TIBC (µmol/L)	36,9 (32,5-44,0)	37,90 (34,40-44,45)	40,05 (35,15-49,78)	44,0 (36,1-49,7)	0,156
Transferin (g/L)	1,63 (1,44-1,78)	1,65 (1,53-1,81)	1,73 (1,54-1,93)	1,70 (1,60-1,97)	0,247
TSAT (%)	33,27 (24,80-37,79)	30,39 (25,37-40,45)	25,42 (18,68-32,52) ***	32,68 (25,28-38,93)	0,048
sTfR (mg/L)	1,10 (0,94-1,57)	1,23 (1,07-1,48)	1,40 (0,84-1,86)	1,36 (0,78-1,66)	0,804
Feritin (µg/L)	399,8 (166,7-884,7) *	442,9 (178,4-688,4) **	105,6 (47,9-384,2)	90,0 (31,2-326,6)	<0,001
hsCRP (mg/L)	2,60 (1,70-6,50)	3,60 (1,45-10,75)	4,55 (2,18-12,53)	2,00 (1,15-6,15)	0,367

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajne razlike utvrđene Kruskal-Wallis testom: *Grupa 1 vs Grupa 3 i Grupa 1 vs Grupa 4, $P < 0,05$; **Grupa 2 vs Grupa 3 i Grupa 2 vs Grupa 4, $P < 0,05$; ***Grupa 3 vs Grupa 1 i Grupa 3 vs Grupa 2 i Grupa 3 vs Grupa 4, $P < 0,05$

Tabela 40. Novi hematološki parametri kod ESRD-D grupe bolesnika klasifikovanih prema terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem

Ispitivani parametri	Grupa 1 (N = 19)	Grupa 2 (N = 45)	Grupa 3 (N = 22)	Grupa 4 (N = 17)	P
%HYPO (%)	4,2 (1,2-11,6)	2,7 (1,2-4,4)	3,8 (1,7-6,1)	0,9 (0,4-3,0) #	0,034
LHD% (%)	13,3 (10,3-20,5)	13,8 (9,8-17,7)	14,4 (9,4-25,8)	16,9 (12,2-21,4)	0,390
Maf	96,1 (83,2-108,5) *	98,3 (89,3-102,7) **	110,7 (99,2-118,4)	107,0 (95,2-115,9)	0,003
RET (10 ⁹ /L)	62 (42-88)	70 (53-87)	84 (55-109)	52 (38-75)	0,469
IRF	0,29 (0,25-0,36) ###	0,37 (0,31-0,43)	0,35 (0,32-0,46)	0,30 (0,27-0,37)	0,026
CHr (pg)	32,0 (30,0-34,0)	33,0 (31,5-33,7)	31,1 (29,9-33,7)	32,0 (31,1-34,0)	0,354
RSf (fL)	105,4 (98,7-109,4)	105,0 (102,2-108,3)	105,1 (98,2-108,9)	104,1 (101,0-108,5)	0,857
MRV (fL)	114,8 (107,2-121,6)	116,2 (111,6-123,1)	118,3 (108,9-125,9)	115,6 (108,7-120,1)	0,750
MSCV (fL)	91,0 (86,7-95,0)	89,5 (86,7-93,2)	88,3 (84,2-92,6)	89,9 (86,4-95,2)	0,624
HLR (%)	0,39 (0,30-0,67)	0,65 (0,35-0,79)	0,52 (0,32-0,72)	0,34 (0,17-0,57)	0,052

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajne razlike utvrđene Kruskal-Wallis testom: *Grupa 1 vs Grupa 3 i Grupa 1 vs Grupa 4, $P < 0,05$; **Grupa 2 vs Grupa 3 i Grupa 2 vs Grupa 4, $P < 0,05$; #Grupa 4 vs Grupa 1 i Grupa 4 vs Grupa 2 i Grupa 4 vs Grupa 3, $P < 0,05$; ### Grupa 1 vs Grupa 2 i Grupa 1 vs Grupa 3 i Grupa 3 vs Grupa 4, $P < 0,05$

Od biohemijskih parametara, statistički značajna razlika nađena je prema koncentraciji hepcidina-25, feritina i TSAT. Grupe su se značajno razlikovale prema vrednostima %HYPO, RBC, Hgb, HCT, IRF i Maf. Koncentracija hepcidina-25 i feritina je bila statistički značajno niža, a vrednosti parametara Hgb, HCT i Maf značajno više kod bolesnika bez terapije i kod bolesnika na terapiji *i.v.* gvoždem u odnosu na bolesnike na terapiji ESAs i kombinovanoj terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem. Bolesnici na terapiji *i.v.* gvoždem imali su statistički značajno niže vrednosti TSAT u poređenju sa ostalim grupama.

Vrednosti parametra %HYPO su bile statistički značajno niže u grupi bolesnika bez terapije u odnosu na ostale grupe. Broj eritrocita je bio statistički značajno niži u grupi bolesnika na terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike na terapiji *i.v.* gvoždem, kao i kod bolesnika na terapiji ESAs u odnosu na bolesnike na terapiji *i.v.* gvoždem. Parametar IRF je bio statistički značajno viši u grupi bolesnika na terapiji *i.v.*

gvoždem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike na terapiji ESAs kao i kod bolesnika na terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem u odnosu na bolesnike na terapiji ESAs.

Prema primeni ESAs grupa ESRD-D bolesnika je podeljena na bolesnike koji su na ESAs terapiji: ESAs-th grupa, i na bolesnike koji su bez suplementacije ESAs tokom prethodnih 6 meseci: ESAs-n grupa. ESAs-th grupa bila je sačinjena od 64 bolesnika (32 muškarca i 32 žene), dok je ESAs-n grupu činilo 39 bolesnika (30 muškaraca i 9 žena).

Tabelarni prikaz osnovnih hematoloških parametara, markera statusa gvožđa i inflamacije i novih hematoloških parametara ESRD-D grupe klasifikovanih na osnovu primene ESAs dat je u Tabelama 41, 42 i 43.

Tabela 41. Osnovni hematološki parametri u ESAs-n i ESAs-th

Parametar	ESAs-n (N = 39)	ESAs-th (N = 64)	P
WBC ($10^9/L$)	6,5 (5,9-8,2)	6,3 (5,0-7,4)	0,202
RBC ($10^{12}/L$)	3,82 (3,35-4,21)	3,35 (3,07-3,52)	< 0,001
Hgb (g/L)	117,5 (104,4-127,1)	102,0 (95,2-107,3)	< 0,001
HCT (L/L)	0,36 (0,32-0,40)	0,32 (0,29-0,33)	< 0,001
MCV (fL)	93,6 (90,7-97,5)	94,8 (92,6-97,8)	0,123
MCH (pg)	30,11 (28,89-31,29)	30,70 (29,90-31,71)	0,058
MCHC (g/L)	321,0 (316,5-324,2)	322,3 (318,7-325,6)	0,126
RDW (%)	15,0 (14,0-16,8)	15,3 (14,1-16,5)	0,646
PLT ($\times 10^9/L$)	174 (152-227)	180 (154-215)	0,857

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney U testom; WBC – leukociti, RBC – eritrociti, Hgb – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCH – prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – indeks anizocitoze, PLT - trombociti

Tabela 42. Parametri statusa gvožđa i inflamacije u ESAs-n i ESAs-th

Ispitivani parametri	ESAs-n (N = 39)	ESAs-th (N = 64)	P
Hepcidin-25 (µg/L)	16,36 (10,01-65,98)	59,34 (35,73-109,54)	< 0,001
Serumsko gvožđe (µmol/L)	12,3 (9,2-14,7)	11,7 (9,9-15,8)	0,656
TIBC (µmol/L)	41,0 (36,0-49,5)	37,7 (34,1-44,2)	0,046
TSAT (%)	27,5 (21,6-33,6)	31,4 (24,9-39,0)	0,058
Transferin (g/L)	1,70 (1,56-1,92)	1,64 (1,51-1,81)	0,082
sTfR (mg/L)	1,39 (0,80-1,82)	1,21 (1,02-1,48)	0,469
Feritin (µg/L)	90,0 (37,6-361,5)	421,4 (172,7-704,7)	< 0,001
hsCRP (mg/L)	2,7 (1,5-7,8)	3,0 (1,5-7,6)	0,989

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, TSAT – saturacija transferina, sTfR – solubilni transferinski receptori, hsCRP – visoko-osetljivi C-reaktivni protein

Tabela 43. Novi hematološki parametri u ESAs-n i ESAs-th

Parametri	ESAs-n (N = 39)	ESAs-th (N = 64)	P
%HYPO (%)	2,0 (0,8-4,9)	2,7 (1,2-4,8)	0,418
LHD% (%)	14,9 (11,3-22,1)	13,3 (9,9-18,4)	0,126
Maf	110,5 (98,2-117,5)	98,1 (88,6-102,7)	< 0,001
RET (10 ⁹ /L)	72 (46-99)	70 (49-88)	0,881
IRF	0,34 (0,29-0,43)	0,35 (0,27-0,42)	0,723
CHr (pg)	32,0 (31,0-34,0)	33,0 (31,0-34,0)	0,217
RSf (fL)	105,0 (99,7-108,3)	105,1 (101,8-108,3)	0,532
MRV (fL)	116,8 (108,9-122,4)	116,0 (110,2-122,8)	0,983
MSCV (fL)	88,6 (85,9-93,6)	89,7 (86,7-93,9)	0,478
HLR (%)	0,44 (0,29-0,61)	0,61 (0,31-0,74)	0,173

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann-Whitney *U* testom, %HYPO - % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr - sadržaj hemoglobina u retikulocitu, MRV – prosečna zapremina retikulocita

ESRD-D bolesnici na terapiji ESAs imali su statistički značajno više koncentracije hepcidina-25 [59,34 (35,73–109,54) µg/L prema 16,36 (10,01–65,98) µg/L] i koncentracije feritina [421,4 (172,7–704,7) µg/L prema 90,0 (37,6–361,5) µg/L] u odnosu na bolesnike kojima nije bila neophodna terapija ESAs. Nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji Hgb, RBC i HCT između ESA-n i ESA-th grupe. Bolesnici u ESAs-n grupi imali su statistički značajno više koncentracije Hgb [117,5 (104,4–127,1) g/L prema 102,0 (95,2–107,3) g/L, RBC [3,82 (3,35–4,21) x10¹²/L prema 3,35 (3,07–3,52) x10¹²/L] i HCT [0,36 (0,32–0,40) prema

0,32 (0,29–0,33)] u poređenju sa grupom ESAs-th. Primenom ANCOVA testa u cilju eliminacije uticaja koncentracije feritina, koncentracija hepcidina-25 nije se statistički značajno razlikovala između ESAs-n i ESAs-th grupe ($P = 0,250$).

Utvrđeno je da se stepen inflamacije, praćen preko hsCRP, nije statistički značajno razlikovao između ESAs-th i ESAs-n grupe. Takođe, udeo bolesnika sa inflamacijom, definisan koncentracijom hsCRP iznad 5 mg/L, nije bio statistički značajno različit između ispitivanih grupa (41,0% prema 31,3%, $P = 0,395$). Statistički značajna razlika u koncentraciji hemoglobina između muškaraca i žena nije utvrđena u ESAs-th ($P = 0,541$) i ESAs-n ($P = 0,228$) grupi, kao i u kompletnoj ESRD-D grupi ($P = 0,066$).

Rezultati korelacione analize hepcidina-25 sa laboratorijskim parametrima ESRD-D grupe podeljene na osnovu terapije ESAs prikazani su u Tabeli 44.

Tabela 44. Korelacija hepcidina-25*, hematoloških i biohemijskih parametara

Parametri	ESAs-n		ESAs-th	
	Pearsonov koeficijent	<i>P</i>	Pearsonov koeficijent	<i>P</i>
WBC ($\times 10^9/L$)	0,264	0,105	0,274	0,028
RBC ($\times 10^{12}/L$)	-0,366	0,022	-0,141	0,265
Hgb (g/L)	-0,271	0,048	-0,129	0,311
RET* ($\times 10^9/L$)	-0,353	0,027	-0,228	0,035
TIBC ($\mu\text{mol}/L$)	-0,729	< 0,001	-0,522	< 0,001
TSAT (%)	0,393	0,013	0,191	0,130
Transferin (g/L)	-0,704	< 0,001	-0,463	< 0,001
sTfR* (mg/L)	-0,248	0,129	-0,316	0,011
Feritin* ($\mu\text{g}/L$)	0,841	< 0,001	0,755	< 0,001
hsCRP > 5 mg/L	0,299	0,032	0,319	0,010
Haptoglobin (g/L)	0,499	0,001	0,250	0,046

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize; ESAs – agensi stimulacije eritropoeze, ESAs-n – grupa bolesnika bez terapije ESAs, ESAs-th – grupa bolesnika na terapiji ESAs, *-logaritamski transformisani podaci, hsCRP – visoko-osetljivi C-reaktivni protein

Koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno korelirala sa polom u ESAs-n ($r = -0,171$, $P = 0,299$) i ESAs-th grupi ($r = -0,045$, $P = 0,723$) kao i u kompletnoj ESRD-D grupi ($r = -0,187$, $P = 0,059$). Utvrđeno je da je koncentracija hepcidina-25 bila u statistički značajnoj

pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom feritina, hsCRP iznad 5 mg/L i haptoglobina, dok je značajna negativna korelacija nađena između koncentracije hepcidina-25 i apsolutnog broja retikulocita, TIBC i transferina kod kompletne ESRD-D grupe, ESAs-n i ESAs-th grupe.

U cilju identifikacije nezavisnih determinanti koncentracije hepcidina-25 urađena je multipla linearna regresiona analiza koja je uključila varijable koje su statistički značajno korelirale sa koncentracijom hepcidina-25 u Pearsonovoj korelacionoj analizi. Rezultati multiple linearne-regresione analize su prikazani u Tabelama 45 i 46.

Tabela 45. Rezultati multiple linearne regresione analize u ESRD-D grupi

	ESRD-D (N = 103)	P
Korigovan R ²	0,726	< 0,001
	Standardizovan koeficijent β	
Feritin* ($\mu\text{g/L}$)	0,778	< 0,001
RET* ($\times 10^9/\text{L}$)	-0,193	0,001
hsCRP > 5 mg/L	0,143	0,010

ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, Korigovan R² – koeficijent determinacije usklađen brojem nezavisnih promenljivih uključenih u model, *- logaritamski transformisani podaci

Tabela 46. Rezultati multiple linearne regresione analize u ESRD-D grupi prema ESAs

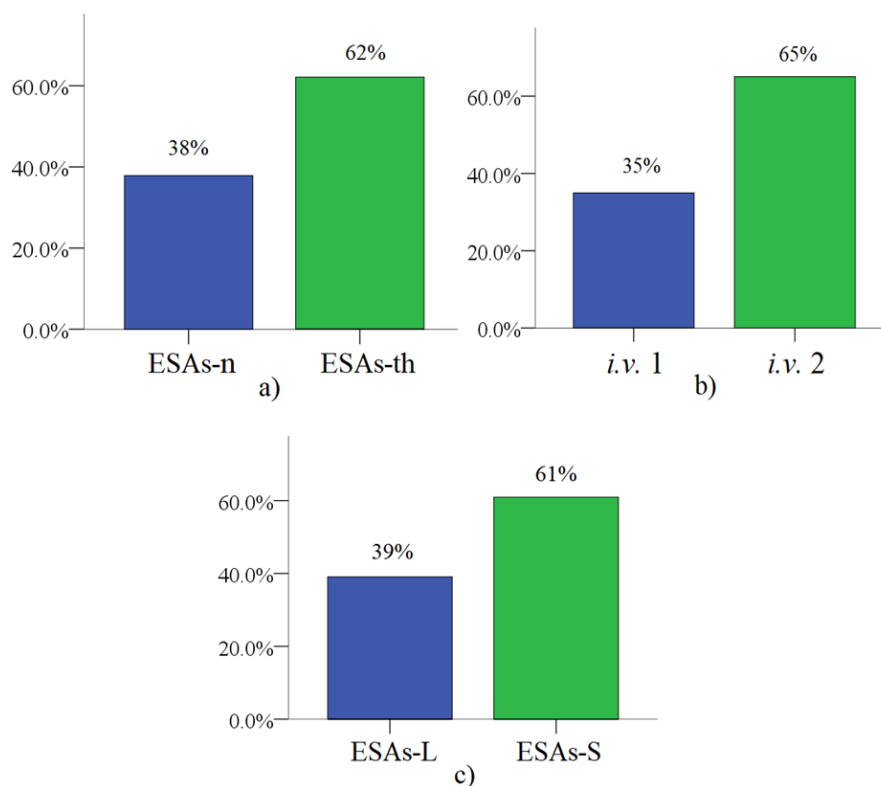
	ESAs-n (N = 39)	P	ESAs-th (N = 64)	P
Korigovan R ²	0,746	< 0,001	0,606	< 0,001
	Standardizovan koeficijent β		Standardizovan koeficijent β	
feritin* ($\mu\text{g/L}$)	0,765	< 0,001	0,677	< 0,001
RET* ($\times 10^9/\text{L}$)	-0,239	0,008	-0,199	0,022
hsCRP > 5 mg/L	0,125	0,161	0,214	0,016

ESRD-D – grupa bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, R² – koeficijent determinacije usklađen brojem nezavisnih promenljivih uključenih u model, *- logaritamski transformisani podaci

Multiplom regresionom analizom utvrđena je značajna povezanost koncentracije feritina i apsolutnog broja retikulocita sa koncentracijom hepcidina-25 u obe ispitivane grupe (ESAs-n i ESAs-th) i kompletnej ESRD-D grupi, dok je prisustvo inflamacije bilo značajno povezano sa koncentracijom hepcidina-25 u ESAs-th grupi kao i kod svih ESRD-D bolesnika (Tabela 45 i Tabela 46). Rezultati multiple regresione analize su pokazali da modeli kod ESRD-

D, ESAs-n i ESAs-th bolesnika opisuju ukupnu varijansu (72,6%, 74,6% i 60,6%, redom) u koncentraciji hepcidina-25 koja se može objasniti prediktorskim varijablama, feritinom, apsolutnim brojem retikulocita i hsCRP iznad 5 mg/L. Feritin i hsCRP iznad 5 mg/L su bili pozitivni, a RET negativni prediktori koncentracije hepcidina-25, pri čemu je feritin bio najznačajniji prediktor sa standardizovanim koeficijentom β od 0,778 u ESRD-D, 0,765 u ESAs-n i 0,677 u ESRD-th grupi.

Za ispitivanje odnosa koncentracije hepcidina-25 u serumu i terapije koja se primenjuje u cilju korigovanja anemije korišćena je grupa od 64 HD bolesnika koji su bili na terapiji održavanja ESAs i grupa od 67 HD bolesnika koji su bili na terapiji *i.v.* gvoždem. Zastupljenost primene ESAs u ESRD-D grupi bolesnika prikazana je na Slici 22.



Slika 22. Zastupljenost primene agenasa stimulacije eritropoeze (ESAs) (a), *i.v.* preparata gvožđa (b) i dugodelujućih (ESA-L) i kratkodelujućih (ESAs-S) ESAs (c) u grupi bolesnika na hemodijalizi; *i.v.* 1 – bez terapije i *i.v.* 2 – na terapiji gvoždem; ESA-n – bez terapije ESAs, ESAs-th – na terapiji ESAs

Na osnovu vrednosti indeksa rezistencije na ESAs (*eng.* *ESA Resistance Index*, ERI), bolesnici ESAs-th grupe podeljeni su na kvartile. Bolesnici u najvišem kvartilu, klasifikovani korišćenjem granične vrednosti $ERI > 11,62$, definisani su kao bolesnici rezistentni na ESAs terapiju (254). Koncentracija hepcidina-25 ESAs rezistentnih bolesnika nije se statistički značajno razlikovala ($P = 0,926$) od onih koji su adekvatno odgovorili na terapiju ESAs, a koji

su prema postavljenom kriterijumu bili u prva tri kvartila [62,79 (35,73–104,45) $\mu\text{g/L}$ prema 57,06 (35,48–111,00) $\mu\text{g/L}$]. Takođe, koncentracija hepcidina-25 nije se statistički značajno razlikovala ($P = 0,788$) između bolesnika koji su primali kratkodelujuće u odnosu na bolesnike na terapiji dugodelujućim ESAs [59,76 (29,80–110,47) $\mu\text{g/L}$ prema 59,30 (36,83–110,26) $\mu\text{g/L}$].

Pearsonovom korelacionom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija između koncentracije hepcidina-25 i dnevne preporučene doze (DDD) ESAs ($r = -0,13$, $P = 0,290$) i doze *i.v.* primenjenog gvožđa ($r = 0,08$, $P = 0,506$). Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija hepcidina-25 sa vrstom ESAs ($r = 0,01$, $P = 0,956$), i sa ERI ($r = 0,12$, $P = 0,330$).

Korelaciona analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost koncentracije hepcidina-25 sa primenom *i.v.* gvožđa u grupi koja nije na terapiji ESAs ($r = 0,043$, $P = 0,794$), u grupi koja je na terapiji ESAs ($r = -0,046$, $P = 0,717$) i kod svih ispitivanih bolesnika ESRD-D grupe ($r = 0,05$, $P = 0,601$). Pearsonov koeficijent korelacije (r) od 0,30 je ukazivao na statistički značajnu povezanost DDD ESAs sa apsolutnim brojem retikulocita ($P = 0,017$).

4.10. Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa retikulocitima

Za ispitivanje povezanosti apsolutnog broja retikulocita i retikulocitnih indeksa sa eritropoetskom aktivnošću koštane srži, tj. efikasnošću tretmana anemije kod bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti, kao i uticaja hepcidina-25 na ove parametre korišćena je grupa od 80 anemičnih bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti (ESRD-A).

Opšte karakteristike, vrednosti biomarkera statusa gvožđa, inflamacije i hematološki parametri ESRD-A bolesnika i zdravih ispitanika prikazani su u Tabelama 47, 48 i 49.

Tabela 47. Osnovni hematološki parametri

Parametar	ESRD-A (N = 80)	KG (N = 30)	P
WBC (10 ⁹ /L)	6,29 (5,21–7,39)	6,20 (5,30–7,01)	0,914
RBC (10 ¹² /L)	3,31 (3,01–3,49)	4,72 (4,43–4,96)	< 0,001
Hgb (g/L) #	98,1 ± 9,7	140,8 ± 13,3	< 0,001
HCT (L/L)	0,31 (0,29–0,33)	0,42 (0,39–0,46)	< 0,001
MCV (fL)	94,1 (92,4–97,3)	88,9 (86,9–92,5)	< 0,001
MCHC (g/L)	323,6 (320,2–328,4)	333,6 (328,1–337,3)	< 0,001
RDW (%)	15,2 (14,0–16,4)	13,2 (12,6–13,7)	< 0,001

Podaci su prikazani kao #srednja vrednost ± standardna devijacija i poređeni *t*-testom ili kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; WBC – leukociti, RBC – eritrociti, Hgb – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – indeks anizocitoze

Tabela 48. Parametri statusa gvožđa i inflamacije

Ispitivani parametri	ESRD-A (N = 80)	KG (N = 30)	P
Hepcidin-25 (µg/L)	55,28 (31,21–105,37)	8,69 (3,89–15,22)	< 0,001
Gvožđe (µmol/L) #	13,0 ± 4,2	17,7 ± 5,1	< 0,001
TIBC (µmol/L)	40,1 (34,3–47,5)	55,0 (50,7–60,6)	< 0,001
TSAT (%)	31,2 (24,7–39,5)	30,9 (24,4–38,3)	0,786
Transferin (g/L)	1,69 (1,52–1,92)	2,36 (2,18–2,61)	< 0,001
sTfR (mg/L)	1,18 (0,86–1,46)	1,19 (1,10–1,31)	0,601
Feritin (µg/L)	256,7 (98,7–660,8)	105,7 (29,6–171,3)	< 0,001
hsCRP (mg/L)	2,45 (1,33–6,48)	0,70 (0,20–1,13)	< 0,001

Podaci su prikazani kao #srednja vrednost ± standardna devijacija i poređeni *t*-testom ili kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann–Whitney *U* testom; TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, TSAT – saturacija transferina, sTfR – solubilni transferinski receptori, hsCRP – visoko-senzitivni C-reaktivni protein

Tabela 49. Novi hematološki parametri

Parametri	ESRD-A (N = 80)	KG (N = 30)	P
%HYPO (%)	1,9 (1,0-4,5)	0,2 (0,1-0,3)	< 0,001
LHD% (%)	11,9 (7,7-16,0)	4,9 (3,5-7,9)	< 0,001
Maf	94,9 (86,7-101,4)	126,3 (114,1-135,9)	< 0,001
RET (10 ⁹ /L)	48,6 (29,2-60,2)	44,4 (32,9-58,2)	0,719
IRF	0,32 (0,25-0,39)	0,26 (0,23-0,31)	0,021
CHr (pg)	33,0 (31,0-34,0)	32,9 (32,0-34,0)	0,518
RSf (fL)	104,2 (100,6-108,1)	98,2 (93,1-100,6)	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Mann-Whitney *U* testom, ESRD-A – grupa anemičnih bolesnika lečena hemodijaliznim tretmanom, %HYPO – % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr - sadržaj hemoglobina u retikulocitu

Grupe su se statistički značajno razlikovale prema parametrima: hepcidinu-25, feritinu, hsCRP, serumskom gvožđu, TIBC, transferinu, RBC, Hgb, HCT, MCV, MCHC, %HYPO, LHD%, RSf, IRF i Maf. Grupa ESRD-A je imala statistički značajno više vrednosti hepcidina-25, feritina, hsCRP, MCV, %HYPO, LHD%, RSf i IRF u poređenju sa KG. Koncentracije serumskog gvožđa, TIBC, transferina, RBC, Hgb, HCT, MCHC i Maf su bile statistički značajno niže u ESRD-A grupi u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabele 47, 48 i 49).

Ispitivana grupa ESRD-A podeljena je prema prethodno procenjenom statusu gvožđa na bolesnike sa apsolutnim nedostatkom gvožđa (ID), bolesnike sa adekvatnim statusom gvožđa (IS) i grupu bolesnika sa pozitivnim balansom statusa gvožđa (PB). U Tabeli 50 prikazani su koncentracija hepcidina-25, eritrocitni indeksi i retikulocitni parametri u formiranim grupama prema procenjenom statusu gvožđa.

Tabela 50. Hepcidin-25, eritrocitni indeksi i retikulocitni parametri u ESRD-A grupi bolesnika klasifikovanih prema statusu gvožđa

Ispitivani parametri	ID (N = 20)	IS (N = 29)	PB (N = 31)	P
Hepcidin-25 (µg/L)	12,25 (4,63–20,43)	53,22 (35,94–78,30) ^{††}	72,78 (56,23–158,42) ^{†, ††}	< 0,001
MCV (fL)	92,9 (91,1–95,0)	93,9 (91,4–97,5)	95,3 (92,7–97,8)	0,123
MCHC (g/L)	322,5 (319,0–327,5)	323,9 (320,0–329,5)	323,8 (320,3–328,1)	0,741
%HYPO (%)	1,2 (0,5–5,2)	3,0 (1,4–4,3)	2,0 (1,2–4,5)	0,338
LHD% (%)	13,1 (8,4–17,8)	11,6 (7,1–16,4)	11,7 (8,0–15,9)	0,741
Maf	94,1 (84,1–100,9)	92,9 (84,5–101,2)	96,1 (88,8–101,7)	0,586
RET (10 ⁹ /L)	44,3 (24,1–55,7)	52,1 (31,8–62,3)	49,1 (33,7–60,7)	0,660
IRF	0,30 (0,26–0,36)	0,34 (0,27–0,39)	0,29 (0,24–0,40)	0,451
CHr (pg)	32,5 (30,3–33,0)	32,0 (31,3–33,8)	33,0 (31,0–34,0)	0,481
RSf (fL)	103,4 (99,6–107,3)	104,9 (100,7–108,4)	104,8 (100,4–108,1)	0,564

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom i poređeni Kruskal-Wallis testom; ID – apsolutni nedostatak gvožđa, IS - adekvatni status gvožđa, PB - pozitivni balans statusa gvožđa; † u poređenju sa IS grupom, †† u poređenju sa ID grupom,

Utvrđena je statistički značajno viša koncentracija hepcidina-25 kod bolesnika u PB grupi u poređenju sa IS ($P = 0,041$) i ID grupom ($P < 0,001$). Grupe se nisu statistički značajno razlikovale prema vrednostima hsCRP ($P = 0,122$), sTfR ($P = 0,513$), RBC ($P = 0,434$), Hgb ($P = 0,697$) i HCT ($P = 0,652$). Vrednost koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika sa apsolutnim nedostatkom gvožđa bila je približna koncentracijama hepcidina-25 u kontrolnoj grupi.

Rezultati korelacione analize koncentracije hepcidina-25 sa eritrocitnim indeksima i retikulocitnim parametrima prikazani su u Tabeli 51.

Tabela 51. Korelacija hepcidina-25 sa eritrocitnim indeksima i parametrima retikulocita

	ID (N = 20)		IS (N = 29)		PB (N = 31)		ESRD (N = 80)	
	rho	P	rho	P	rho	P	rho	P
MCV (fL)	-0,034	0,886	-0,079	0,684	-0,229	0,215	0,022	0,847
MCHC (g/L)	0,185	0,435	-0,111	0,568	-0,269	0,143	0,051	0,653
%HYPO (%)	-0,475	0,034	-0,050	0,799	0,103	0,580	-0,004	0,972
LHD (%)	-0,185	0,435	0,111	0,568	0,269	0,143	-0,051	0,653
Maf	-0,030	0,899	-0,057	0,768	-0,285	0,120	-0,029	0,798
RET ($10^9/L$)	-0,446	0,048	0,077	0,690	-0,371	0,040	-0,124	0,274
IRF	-0,576	0,010	-0,002	0,990	-0,182	0,336	-0,203	0,076
CHr (pg)	0,033	0,890	-0,103	0,600	-0,497	0,004	-0,092	0,419
RSf (fL)	-0,131	0,593	-0,120	0,543	-0,444	0,014	-0,148	0,200

Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize, rho – Spearmanov koeficijent korelacije, MCV – prosečna zapremina eritrocita, MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, %HYPO – % hipohromnih eritrocita, RET – retikulociti, IRF – frakcija nezrelih retikulocita, CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu

Korelacionom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije koncentracije hepcidina-25 sa %HYPO ($P = 0,034$), apsolutnim brojem retikulocita ($P = 0,048$) i IRF ($P = 0,010$) u ID grupi (Tabela 51), pri čemu su više vrednosti %HYPO, apsolutnog broja retikulocita i IRF praćene nižim koncentracijama hepcidina-25. Jedino je u PB grupi bolesnika nađena statistički značajna negativna korelacija koncentracije hepcidina-25 sa CHr i RSf (Tabela 51). Koncentracija hepcidina-25 bila je značajno povezana sa apsolutnim brojem retikulocita ($\beta = -0,388$, $P = 0,031$) u PB grupi ispitanika. Koeficijent determinacije korigovan za broj nezavisnih prediktora (R^2) iznosio je 0,121.

Rezultati multiple linearne regresione analize povezanosti ispitivanih parametara sa vrednostima CHr i RSf prikazani su u Tabeli 52.

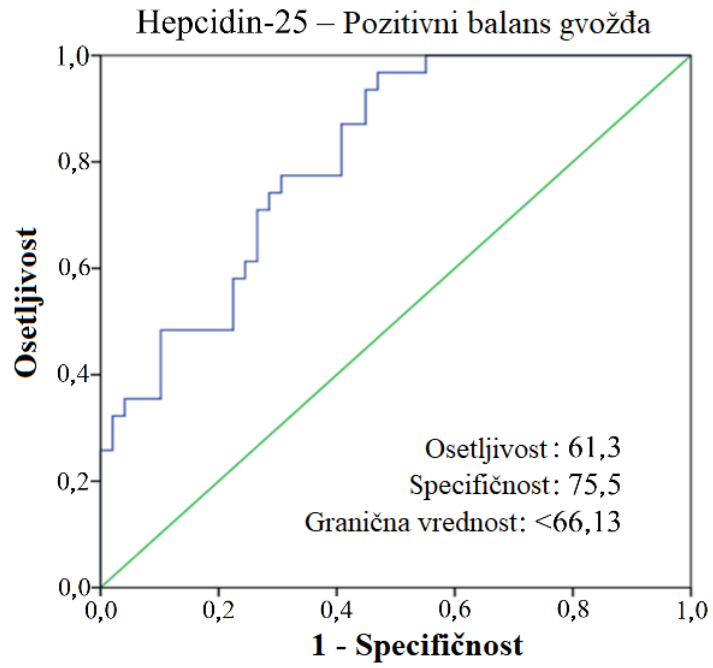
Tabela 52. Modeli multiple linearne regresione analize u grupi ESRD-A bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa

Varijable povezane sa CHr	Standardizovan koeficijent β	<i>P</i>	Varijable povezane sa RSf	Standardizovan koeficijent β	<i>P</i>
Hepcidin-25* (µg/L)	-0,493	0,004	Hepcidin-25* (µg/L)	-0,334	0,036
sTfR* (mg/L)	-0,414	0,011	RBC (10 ¹² /L)	-0,384	0,016
hsCRP* (mg/L)	-0,324	0,038	IRF*	0,317	0,047

CHr – sadržaj hemoglobina u retikulocitu, sTfR – solubilni transferinski receptori, hsCRP – visoko-osetljivi C-reaktivni protein, *varijable čije su distribucije vrednosti normalizovane log₁₀ transformacijom

Multipla linearna regresiona analiza primenjena na grupi bolesnika sa PB (u modelu koji je uključio hsCRP i sTfR) pokazala je statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na CHr ($\beta = -0,493$, $P = 0,004$). Model multiple regresione analize je objasnio 38% varijanse u vrednostima CHr (korigovani $R^2 = 0,384$, $P = 0,001$) (Tabela 52). U cilju identifikacije nezavisnih determinanti nivoa RSf korišćen je model multiple regresione analize koji je uključio nezavisne varijable RBC, IRF i hepcidin-25. Rezultati multiple regresione analize pokazali su da su hepcidin-25 ($\beta = -0,334$, $P = 0,036$), RBC ($\beta = -0,384$, $P = 0,016$) i IRF ($\beta = 0,317$, $P = 0,047$) značajno uticali na nivo RSf. Navedene varijable zajedno su objašnjavale 37% ukupne varijanse RSfs (korigovani $R^2 = 0,366$, $P = 0,002$, Tabela 52).

ROC analizom ispitane su dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 kao markera za razlikovanje anemičnih ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa u odnosu na ostale ESRD bolesnike. Dijagnostičke karakteristike i ROC kriva hepcidina-25 prikazane su na Slici 23. Optimalna granična vrednost hepcidina-25 za isključivanje pozitivnog balansa gvožđa iznosila je 66,13 µg/L, sa osetljivošću od 61,3% i specifičnošću od 75,5%. Površina ispod krive (AUC) iznosila je 0,808 (95% IP = 0,717 – 0,900, standardna greška = 0,047, $P < 0,001$) (Slika 23). Primenom logističke regresione analize u modelu koji je uključio markere i hematološke indekse koji nisu korišćeni u selekciji grupa bolesnika: %HYPO, CHr, sTfR i hepcidin-25, zaključeno je da je jedini marker koji je statistički značajno povezan sa PB bio hepcidin-25 sa koncentracijom iznad granične vrednosti od 66,13 µg/L (količnik verovatnoće = 4,78 [95% IP = 1,71–13,36], $P = 0,003$).



Površina ispod krive (AUC)	0,808
Standardna greška	0,047
95% Interval poverenja	0,717 – 0,900
Značajnost	<0,001

Slika 23. ROC kriva za isključivanje pozitivnog balansa gvožđa

4.11. Varijante u genu *TMPRSS6* i *HFE*, koncentracija hepcidina-25 i status gvožđa

Raspodela varijanti A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE* u grupi ESRD bolesnika klasifikovanih prema polu prikazana je u Tabeli 53.

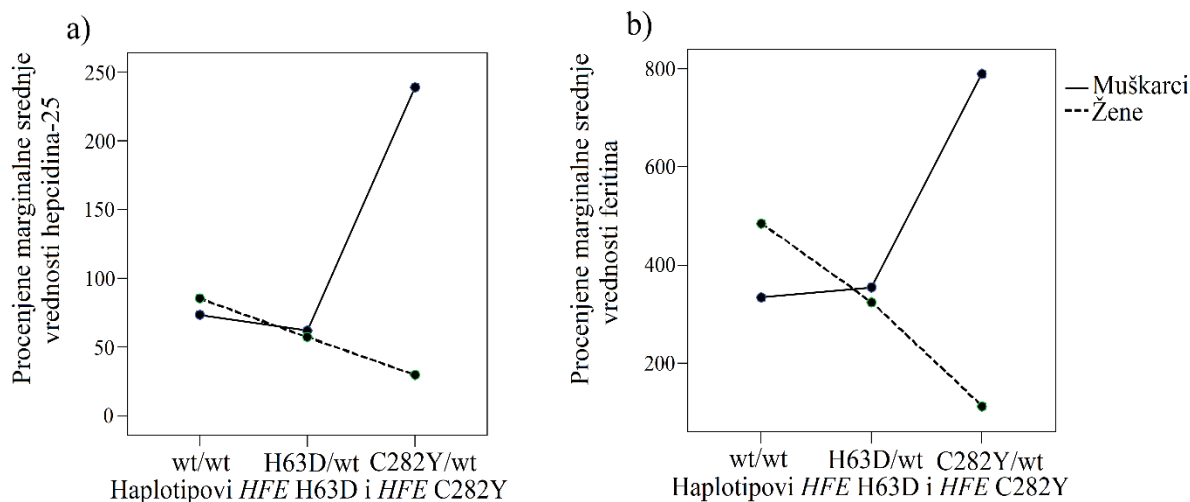
Tabela 53. Zastupljenost genskih varijanti *TMPRSS6* i *HFE* (prikazanih u %) prema polu

Genotip/alel	Žene (N = 54)	Muškarci (N = 72)	P
<i>TMPRSS6 A736V</i>			
A/A	14,8	20,8	0,653
A/G	48,1	47,2	
G/G	37,0	31,9	
A alel	39,0	44,0	0,377
H-W (<i>Chi square, P</i>)	0,009 (0,923)	0,138 (0,710)	
<i>TMPRSS6 A736V (dominanti model nasleđivanja)</i>			
G/G	37,0	31,9	0,551
A/G i A/A	63,0	68,1	
<i>HFE H63D</i>			
C/C	72,2	83,3	0,133
C/G	27,8	16,7	
G/G	0	0	
G alel	13,9	8,3	0,158
H-W (<i>Chi square, P</i>)	1,407 (0,495)	0,598 (0,742)	
<i>HFE C282Y</i>			
G/G	94,4	95,8	0,717
G/A	5,6	4,2	
A/A	0	0	
A alel	2,8	2,1	0,720
H-W (<i>Chi square, P</i>)	0,033 (0,984)	0,044 (0,977)	
<i>HFE Haplotipovi</i>			
wt/wt	66,7	79,2	0,279
C282Y/wt	5,6	4,2	
H63D/wt	27,8	16,7	

H-W - Hardy–Weinbergova ravnoteža

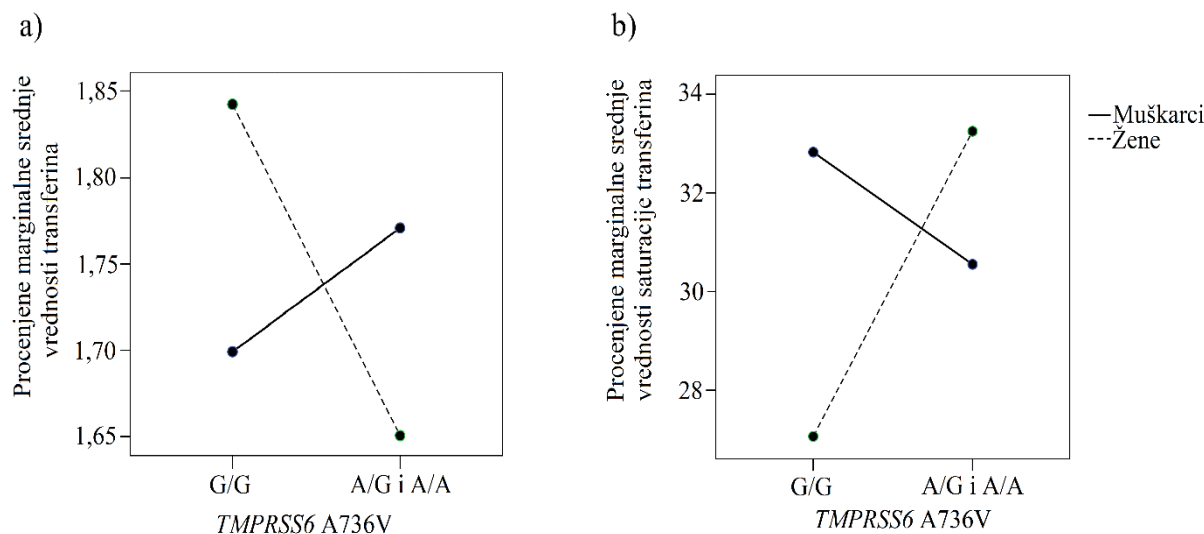
Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti varijanti gena *TMPRSS6* A736V, *HFE* H63D i *HFE* C282Y, kao i *HFE* haplotipova između muškaraca i žena u grupi ESRD bolesnika (Tabela 53).

Kombinovani uticaj pola i haplotipova dve *HFE* kao i *TMPRSS6* A736V varijante na markere statusa gvožđa ispitana je dvofaktorskom analizom varijanse sa odgovarajućim *post hoc* analizama: *least significant difference* i *Sidak multiple comparison* testom. Utvrđena je statistički značajna razlika u uticaju haplotipa *HFE* gena (H63D/C282Y) na koncentraciju hepcidina-25 ($P = 0,005$) i feritina ($P = 0,027$) kod muškaraca i žena u ESRD (Slika 24). Veličina uticaja je bila umerena i na koncentraciju hepcidina-25 (*partial eta squared* = 0,09) i na koncentraciju feritina (*partial eta squared* = 0,06). Naknadna poređenja korišćenjem *Sidak multiple comparison* testa su pokazala da muškarci sa haplotipom C282Y/wt imaju statistički značajno više koncentracije hepcidina-25 u poređenju sa muškarcima sa haplotipom H63D/wt ($P = 0,002$), u poređenju sa muškarcima sa haplotipom wt/wt ($P = 0,002$) i u poređenju sa ženama istog haplotipa C282Y/wt ($P = 0,001$; Slika 25). Takođe, poređenjem koncentracije feritina u odnosu na pol, utvrđeno je da su muškarci sa haplotipom C282Y/wt imali statistički značajno višu koncentraciju feritina ($P = 0,029$) u poređenju sa ženama istog haplotipa (Slika 24).



Slika 24. Efekti haplotipova *HFE* gena (*HFE* H63D i *HFE* C282Y) na serumske koncentracije (a) hepcidina-25 (µg/L) i (b) feritina (µg/L) u odnosu na pol kod ESRD bolesnika

Koncentracija serumskog transferina bila je pod zajedničkim uticajem pola i A736V varijante u genu *TMPRSS6* u grupi ESRD bolesnika ($P = 0,002$, $partial eta squared = 0,07$) (Slika 25).



Slika 25. Kombinovani efekti polimorfizma *TMPRSS6* A736V i pola na koncentraciju (a) transferina (g/L) i (b) saturaciju transferina (%) ESRD bolesnika

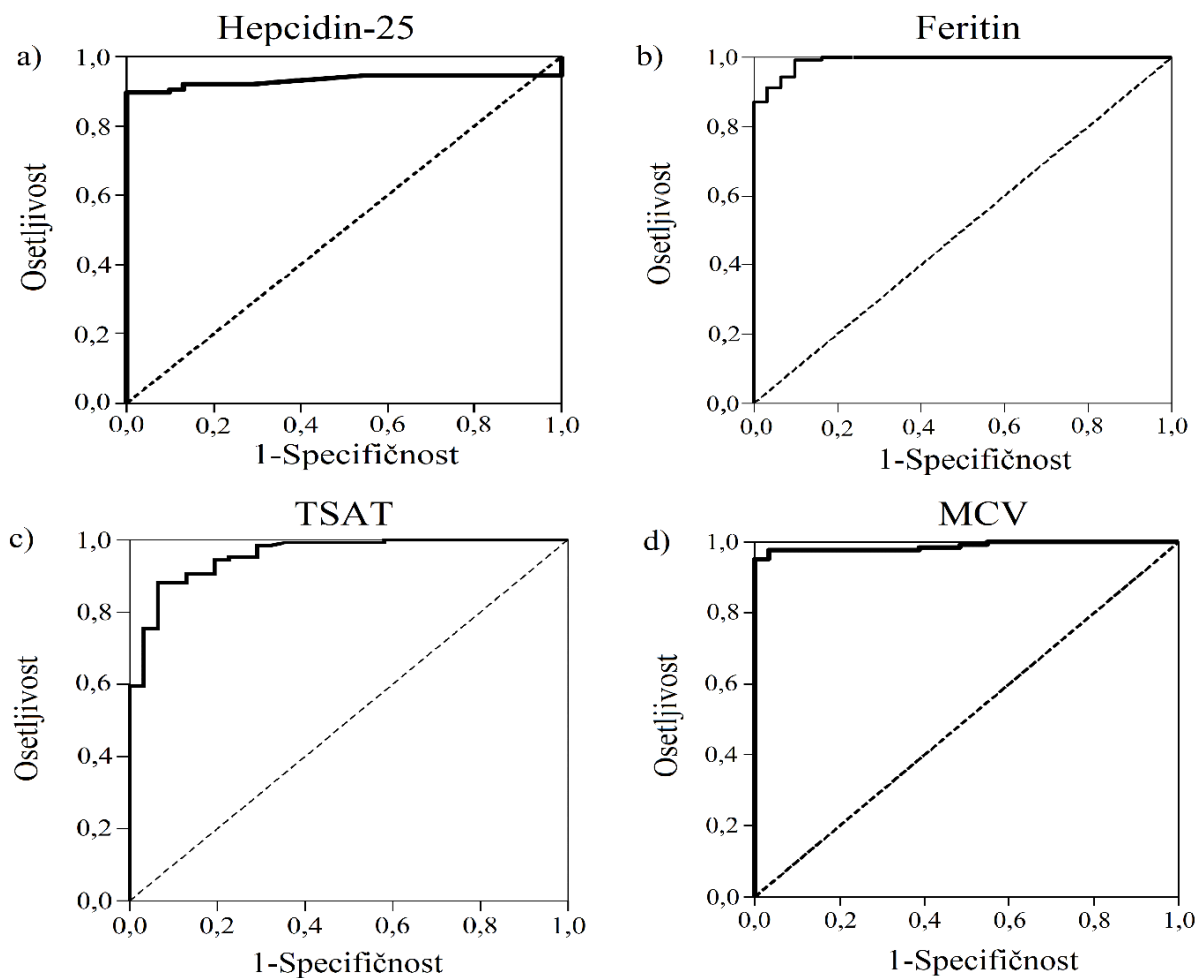
Kada su u pitanju *TMPRSS6* A736V varijante, analizirana je grupa G/G homozigota u odnosu na nosioce A alela (homozigoti A/A ili heterozigoti A/G) prema dominantnom modelu nasleđivanja. Žene koje su nosile rizični A alel imale su statistički značajno niže koncentracije transferina u odnosu na žene G/G homozigote ($P = 0,002$) i muškarce bez obzira na *TMPRSS6* gensku varijantu [u poređenju sa muškarcima sa G/G ($P = 0,018$) i u poređenju sa muškarcima nosiocima rizičnog A alela ($P = 0,048$)]. Udruženi uticaj pola i varijante A736V u genu *TMPRSS6* na TSAT prikazan je na Slici 25. Iako je uticaj bio na granici statističke značajnosti ($P = 0,058$, $partial eta squared = 0,03$), uočeno je da su vrednosti saturacije transferina kod žena sa rizičnim A alelom više u odnosu na žene homozigote sa G/G, a da je verovatnoća bila blizu statističke značajnosti ($P = 0,063$).

4.12. Ispitivanje dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije

Za ispitivanje dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa, kao i određivanje optimalne granične vrednosti hepcidina-25 u serumu na osnovu koje bi se mogla razlikovati anemija hronične bolesti od sideropenijske anemije korišćena je ESRD grupa

sačinjena od 126 bolesnika i IDA grupa koju su činile 31 ispitanica sa sideropenijskom anemijom.

Procena dijagnostičkih karakteristika parametara statusa gvožđa i određivanje optimalnih graničnih vrednosti za razlikovanje anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije ispitana je ROC analizom. Na Slici 26 prikazani su rezultati ROC analize za hepcidin-25, feritin, TSAT i MCV. Dijagnostičke karakteristike hepcidina-25, feritina, TSAT i MCV su prikazane u Tabeli 54.



Slika 26. Rezultati ROC analize hepcidina-25, feritina, TSAT i MCV u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije

Tabela 54. Rezultati ROC analize u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije

Ispitivani parametar	Granična vrednost	Osetljivost	Specifičnost	AUC	Standardna greška	<i>P</i>
Hepcidin-25 (µg/L)	≥ 9,32	90%	100%	0,932	0,021	< 0,001
Feritin (µg/L)	≥ 48,2	87%	100%	0,991	0,006	< 0,001
TSAT (%)	≥ 16,8	91%	84%	0,958	0,017	< 0,001
MCV (fL)	≥ 81	90%	100%	0,988	0,007	< 0,001

AUC – površina ispod operativne krive, TSAT – saturacija transferina, MCV – prosečna zapremina eritrocita

Rezultati ROC analize ukazali su na odlične dijagnostičke karakteristike ispitivanih parametara sa AUC većim od 0,9 za sve parametre. Optimalna granična vrednost za hepcidin-25 iznosila je 9,32 µg/L (AUC = 0,932, osetljivost 90%, specifičnost 100%). Najveća AUC je nađena za feritin i iznosila je 0,991, dok su za MCV i TSAT bile 0,988 i 0,958, respektivno (Tabela 54).

5. Diskusija

Hronična bubrežna slabost ima značajan uticaj na zdravlje ljudi širom sveta u pogledu direktnog uzroka globalnog morbiditeta i mortaliteta i sa aspekta važnog faktora rizika za kardiovaskularne bolesti (167, 168). Rezultati nedavno publikovanog istraživanja (167) govore da je samo u 2017. godini HBS dovela do 1,2 miliona smrtnih slučajeva i bila 12. vodeći uzrok smrtnog ishoda širom sveta (167). Literaturni podaci govore da je 2017. godine zabeleženo 697,5 miliona slučajeva HBS svih stadijuma širom sveta, što čini globalnu prevalencu od 9,1%. Danas se smatra da porast globalne prevalencije HBS za 29,3% u periodu od 1990 - 2017. može biti objašnjena uticajem porasta prevalencije dijabetesa, hipertenzije, gojaznosti i starenja svetske populacije (167).

Incidenca dijalize i transplantacije na globalnom nivou je takođe porasla od 1990 – 2017. godine (43,1% za dijalizu i 34,4% za transplantaciju), što ukazuje na veću dostupnost ovog vida lečenja. Danas broj bolesnika lečenih nekom od metoda zamene bubrežne funkcije premašuje 2,5 miliona i predviđa se da će do 2030. godine dosegnuti 5,4 miliona. Trenutno u mnogim zemljama postoje problemi u pružanju medicinske pomoći u vidu lečenja metodama zamene bubrega, a procenjuje se da je čak 2,3 – 7,1 miliona odraslih umrlo prerano zbog nedostupnosti ovog vida lečenja (166, 167).

Rasprostranjenost HBS u Republici Srbiji, u populaciji odraslih, prema podacima sistematske analize studije Global Burden of Disease Study 2017 (167) prati globalnu statistiku po kojoj 8,4% individua boluje od HBS. Nedavno publikovana meta-analiza (166), koja je obuhvatila rezultate 100 studija sprovedenih na oko 6,9 miliona HBS pacijenata, pokazala je da procenjena globalna prevalenca stadijuma 5 HBS ($eGFR < 15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) iznosi 0,1%. Rezultati određeni na populaciji naše zemlje pokazali su sličnu prevalencu ESRD (0,07%) (166, 167, 175) sa hemodijalizom kao najzastupljenijom metodom zamene bubrežne funkcije (74,3%) (175).

Više od 60 godina anemija u inflamaciji je prepoznata kao blaga do umereno teška anemija (nivo hemoglobina od 70 do 120 g/L) koja se razvija u kontekstu sistemske inflamacije i smanjene produkcije eritrocita praćene umerenim skraćanjem životnog veka eritrocita (68, 133). U pogledu homeostaze gvožđa, smatra se da je anemija u inflamaciji primarno poremećaj u distribuciji gvožđa (68, 133, 258). Detaljna statistika o prevalenci anemije u inflamaciji nije dostupna, mada se procenjuje da se čak 40% svih anemija može smatrati anemijom u inflamaciji ili kombinovanom anemijom, što na globalnom nivou predstavlja više od 1

milijarde obolelih (259, 260). To postavlja anemiju u inflamaciji na drugo mesto uzroka anemije globalno, odmah nakon sideropenijske anemije (133) i najučestalijom anemijom kod hospitalizovanih ili bolesnika sa hroničnim oboljenjima (133, 259).

Podaci opservacionih studija ukazuju da je anemija povezana sa neželjenim ishodima u svim bolesnim stanjima, uključujući ESRD (261-263). Anemija u sklopu ESRD je značajno povezana sa mortalitetom, smanjenim kvalitetom života, kognitivnim poremećajima, povećanom potrebom za transfuzijama, većom frekvencijom hospitalizacije i povećanim rizikom od neželjenih kardiovaskularnih događaja (171, 172, 230, 263, 264). U patofiziologiji anemije u ESRD, pored poremećaja metabolizma gvožđa, dodatno su uključena dva mehanizma: smanjena produkcija eritropoetina zbog bubrežne slabosti i supresija eritropoeze direktnim uticajem citokina na koštanu srž. Progresijom bubrežne bolesti i smanjenjem procenjene brzine glomerularne filtracije raste incidenca anemije i zahvata gotovo sve obolele u ESRD (171, 172).

U prikazanom istraživanju, koje predstavlja studiju preseka, imali smo za cilj da odredimo koncentraciju hepcidina-25 u serumu bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti, osoba sa sideropenijskom anemijom i zdravih ispitanika. Zatim, cilj je bio ispitati povezanost koncentracije hepcidina-25 sa hematološkim parametrima, markerima statusa gvožđa i inflamacije, odnosa sa terapijom koja se primenjuje u cilju korigovanja anemije i povezanost sa apsolutnim brojem retikulocita i eritrocitnim i retikulocitnim indeksima kod bolesnika u ESRD. U pogledu uticaja genetskih faktora na sintezu hepcidina-25, jedan od postavljenih ciljeva bio je određivanje zastupljenosti i uticaja polimorfizma dva gena, *TMPRSS6* (A736V) i *HFE* (C282Y i H63D) na koncentraciju hepcidina-25 i parametre statusa gvožđa. Takođe, ispitivana je zastupljenost varijanti haplotipa C282Y i H63D *HFE* u odnosu na pol i razlike u koncentraciji hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u odnosu na C282Y i H63D *HFE*. U skladu sa postavljenim ciljevima ova studija je ispitala dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 i markera statusa gvožđa i odredila graničnu vrednost hepcidina-25 na osnovu koje bi se mogla razlikovati sideropenijska od anemije hronične bolesti.

5.1. Opšti podaci o ispitanicima

Istraživanje je obuhvatilo 126 bolesnika u ESRD, 31 ispitanicu sa dijagnostikovanom sideropenijskom anemijom i 30 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu grupu. Najzastupljeniji uzrok terminalne bubrežne slabosti u ispitivanoj grupi bolesnika bila je

arterijska hipertenzija, kod 26,2% pacijenata. Zatim slede glomerulonefritis kod 15,9% i diabetes melitus kod 13,5% bolesnika. Naši podaci prate globalnu statistiku etiologije HBS u razvijenim zemljama, gde se kao vodeći uzročnici navode najzastupljenije osnovne bolesti uočene i u našem istraživanju (167). Takođe, podaci našeg istraživanja se slažu sa rezultatima epidemiološke studije na populaciji Srbije objavljenim od strane Đukanović i sar. (175).

5.2. Koncentracija hepcidina-25 u serumu bolesnika u ESRD, osoba sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe

Rezultati prikazane studije jasno ukazuju da je koncentracija hepcidina-25 u grupi bolesnika u ESRD bila značajno viša u odnosu na zdrave ispitanike kontrolne grupe (53,98 vs 8,69 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$) što je u skladu sa rezultatima prethodno publikovanih studija (35, 39, 223, 242, 244, 249, 250, 265, 266). Dobijeni rezultati su očekivani s obzirom na činjenicu da se ESRD smatra hroničnim inflamatornim stanjem sa povećanim telesnim rezervama gvožđa, koji su dobro poznati faktori indukcije sinteze hepcidina-25 (11, 21).

Prethodna istraživanja uzimala su u razmatranje hipotezu da hepcidin-25, kao osnovni regulator metabolizma gvožđa, može imati ulogu značajnog medijatora u patogenezi anemije u sklopu hroničnih bolesti. U vezi sa ovim pitanjem, objavljen je niz studija sprovedenih na populaciji bolesnika u ESRD (222, 223, 227, 267-269). Direktno merenje koncentracije biološki aktivne forme hormona hepcidina-25 u serumu smatra se pouzdanim markerom homeostaze gvožđa u populaciji bolesnika sa HBS, jer samo u ovom obliku hepcidin-25 ne zavisi od brzine glomerularne filtracije (244). Međutim, još uvek ne postoji konačna saglasnost da je povišena koncentracija hepcidina u krvi stalna i prepoznatljiva odlika bolesnika u ESRD (268). Takođe, ne postoji opšta usaglašenost po pitanju dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 u razlikovanju ACD od IDA (268). Jedno od mogućih objašnjenja navedene neusaglašenosti jeste uključivanje naizgled zdravih ispitanika u kontrolnu grupu samo na osnovu koncentracije proteina akutne faze (CRP, feritin) i koncentracije gvožđa u serumu, što nije pouzdan metod da bi se isključile subkliničke karakteristike anemije (268). U našem istraživanju kontrolne grupe su odabrane na način koji sprečava preklapanje IDA i ACD. Naime, pored grupe zdravih dobrovoljaca bez anemije, sa markerima statusa gvožđa i inflamacije u okviru referentnog opsega i bez terapije, za IDA grupu smo izabrali pacijente sa sideropenijskom anemijom (koncentracija hemoglobina $< 110 \text{ g/L}$, MCV $< 80 \text{ fL}$, feritin $< 20 \mu\text{g/L}$), normalnim eGFR i bez inflamacije (hsCRP $< 10 \text{ mg/L}$).

Koncentracija hepcidina-25 u IDA grupi je iznosila 3,00 µg/L i u skladu je sa podacima objavljenim od strane Thomas i sar. (270) koji su u grupi od 52 ispitanika sa dijagnostikovanom IDA odredili koncentraciju hepcidina-25 od 2,79 µg/L (1,0 nmol/L) (270). Rezultati našeg istraživanja su pokazali statistički značajno niže vrednosti hepcidina-25 u grupi pacijenata sa IDA u odnosu na grupu bolesnika u ESRD (3,00 prema 53,98 µg/L, $P < 0,001$) i kontrolnu grupu (3,00 prema 8,69 µg/L, $P < 0,001$) što se slaže sa literaturnim podacima (38, 197, 242, 270). Dobijeni rezultati su očekivani i mogu se objasniti različitim mehanizmom nastanka sideropenijske i anemije u inflamaciji (68, 271). Negativni balans gvožđa se razvija kroz ispražnjene depoe gvožđa i eritropoezu sa deficitom gvožđa, a vodi nastanku anemije zbog deficita gvožđa koju karakteriše sinteza mikrocitnih hipohromnih eritrocita (271). Ispitivana grupa IDA je bila sačinjena od žena u reproduktivnom periodu koje su u većem stepenu izložene razvoju sideropenijske anemije zbog povećanih potreba u gvožđu usled većeg gubitka putem mensturalnog krvarenja, smanjenog unosa i neadekvatne ishrane (10, 271). Kod apsolutnog deficita gvožđa i sideropenijske anemije, usled ispražnjenih depoa gvožđa, BMP-SMAD signalizacija je inhibirana na više nivoa što vodi suprimiranju ekspresije hepcidina. Naime, zbog deficita gvožđa sinusoidne endotelne ćelije jetre (LSECs) u manjoj meri sintetisuje BMP2 i BMP6 (11), dolazi do sekvenciranja HFE sa TFR1 i smanjene sinteze TFR2, povećane aktivnosti matriptaze-2 i furina i posledično odvajanja hemojuvelina (75, 131), kao i suprimiranja lokusa hepcidina od strane histon deacetilaze 3 (79). Smatra se da je supresija sinteze hepcidina u stanju apsolutnog deficita gvožđa kompenzatorni mehanizam koji pospešuje apsorpciju gvožđa (271). Kada je anemija teškog stepena, udružena hipoksija stimuliše eritropoezu kroz povećanu sintezu i oslobađanje eritropoetina iz bubrega. Navedeni proces dovodi do produkcije eritroferona (ERFE) od strane eritroblasta (155), koji odvajaju BMP2/6, a kao rezultat dovodi do inhibicije ekspresije *HAMP* gena koji kodira sintezu hepcidina (80).

Sa druge strane, kod bolesnika u ESRD sistemska inflamacija dovodi do aktivacije imunskih ćelija i sinteze inflamatornih citokina koji su odgovorni za pojavu poremećaja i u ranom periodu eritropoeze, koji je zavisen od eritropoetina, i u kasnom, koji zavisi od gvožđa (68, 216). Interleukin 6 (IL-6) se smatra potentnim stimulatorom sinteze hepcidina-25, koji ovu funkciju ostvaruje indukovanjem JAK/STAT3 signalnog puta (11, 135). Pored inflamacije, povišenoj koncentraciji ukupnog hepcidina kod bolesnika u ESRD dodatno doprinosi smanjeno izlučivanje zbog oštećenja bubrega (245).

Galesloot i sar. (38) su sproveli opsežno istraživanje na 1948 zdravih ispitanika koje je imalo za cilj utvrđivanje referentnih vrednosti koncentracije hepcidina-25 u odnosu na pol i starost (38). Autori navedene studije su zaključili da su koncentracija hepcidina kod muškaraca konstantna tokom godina i da je viša u odnosu na koncentraciju kod žena koje imaju tendenciju ka višim koncentracijama hepcidina tokom menopauze. Bitan zaključak autora je da je hepcidin jako i pozitivno korelira sa feritinom kod oba pola (38, 197, 242, 270). U skladu sa analizom Galesloot i sar. je i zaključak istraživanja Asby i sar. kod zdravih ispitanika (242). Suprotno navodima Galesloot i sar. i Asby i sar. došli su van der Weerd i sar. (245) koji su u istraživanju na bolesnicima u ESRD utvrdili značajno više koncentracije hepcidina-25 kod žena u poređenju sa muškarcima (245). U našoj studiji nađene su više koncentracije hepcidina-25 kod žena u poređenju sa muškarcima u ESRD (61,13 prema 47,37 $\mu\text{g/L}$), koje nisu pokazale statistički značajnu razliku ($P = 0,380$). Iako su dokazali značajnu razliku, Ashby i sar. (242) su naglasili da su razlike u koncentraciji hepcidina-25 između polova u potpunosti posledica interindividualnih varijacija u koncentraciji feritina (242). Koncentracija feritina kod zdravih premenopauzalnih žena je približno za 38% niža u odnosu na muškarce, dok se ova razlika gubi između postmenopauzalnih žena i muškaraca. Koncentracija feritina je uslovljena i godinama, tj. raste do 65. godine, nakon koje se izjednačava kod oba pola (10). Značajno viša starost ESRD grupe i odsustvo statistički značajne razlike u pogledu koncentracije feritina između žena i muškaraca (304,2 prema 214,9 $\mu\text{g/L}$, $P = 0,455$) mogu biti jedan od razloga neutvrđivanja značajne razlike između polova u koncentraciji hepcidina-25 u našem istraživanju.

5.3. Analiza zastupljenosti polimorfizma gena: *TMPRSS6* (A736V) i *HFE* (C282Y i H63D)

Nedavne studije asocijacije na celokupnom genomu (*eng. Genome Wide Association Studies*, GWAS) su pokazale da veoma česti polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*eng. Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) u genu *TMPRSS6* zajedno sa mutacijama *HFE* gena predstavljaju značajnu determinantu varijacije statusa gvožđa u opštoj populaciji (272). Nai i sar. (90) su utvrdili da je varijanta A736V u genu *TMPRSS6* česta u opštoj populaciji sa prevalencom rizičnog alela od 45% (90), dok su rezultati Pelusi i sar. (222) ukazali da je navedena prevalenca 46,2% kod bolesnika u ESRD lečenih hemodijalizom i 43,4% kod zdravih ispitanika (222). Rezultati našeg istraživanja su pokazali zastupljenost rizičnog alela varijante

A736V u genu *TMPRSS6* od 42% u KG i kod bolesnika u ESRD, što je u skladu sa rezultatima studije Nai i sar. (90) i Pelusi i sar. (222). Međutim, nekoliko studija je ukazalo da je povezanost varijanti gena *HFE* (C282Y i H63D) i *TMPRSS6* (A736V) sa parametrima statusa gvožđa nezavisna od koncentracije hepcidina u opštoj populaciji (93, 273). Malo je literaturnih podataka o učestalosti i specifičnom uticaju pomenutih varijanti na hepcidin-25 i parametre statusa gvožđa kod bolesnika u ESRD. Rezultati naše studije nisu pokazali da postoji značajna razlika u zastupljenosti genotipova varijanti A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE* između ESRD, IDA i KG, što potkrepljuju nalazi objavljeni od strane Pelusi i sar. (222).

C282Y predstavlja najzastupljeniji polimorfizam gena *HFE* u naslednoj hemohromatozi tip I (84, 87). Rezultati meta analize koja je obuhvatila 36 studija sprovedenih na opštoj populaciji ispitanika bele rase širom sveta su pokazali učestalost rizičnog alela za C282Y od 6,2% i učestalost homozigotne varijante C282Y *HFE* od 0,38% (274). U evropskoj populaciji prevalenca homozigotne varijante C282Y se kreće u opsegu od 0,2 do 0,5%, pri čemu je niža u Južnoj i Istočnoj u odnosu na Severnu Evropu (87, 274). U našem istraživanju smo utvrdili da je učestalost rizičnog alela varijante C282Y bila niska u grupama i nije se statistički značajno razlikovala između grupa (2,4% u ESRD, 3,2% u IDA i 1,6% u KG, $P = 0,667$). Naši rezultati se slažu sa niskom prevalencom rizičnog alela varijante C282Y na globalnom nivou (6,2%) i na području Evrope (najviša 12,5% u Irskoj do 0% u Južnoj Evropi) (274), kao i sa podacima Šarić i sar. koji su utvrdili učestalost od 1,6% na opštoj populaciji Srbije i Crne Gore (275) i sa podacima Pelusi i sar. dobijenim na populaciji bolesnika sa HBS (2,8%) (222). Homozigotna varijanta A/A C282Y *HFE* nije detektovana u našoj studiji, što se slaže sa niskom prevalencom za Južnu i Istočnu Evropu (274), kao i sa podacima Šarić i sar. (275) i Pelusi i sar. koji takođe nisu detektovali nosioca homozigotne varijante C282Y u grupi bolesnika sa HBS i kontrolnoj grupi (222).

H63D je drugi po učestalosti polimorfizam *HFE* (87). Naši rezultati su pokazali da se učestalost rizičnog alela H63D nije razlikovala između grupa i da je iznosila 15% u KG, što se slaže sa rezultatima dobijenim na opštoj populaciji globalno (14%) (274) i sa podacima dobijenim na opštoj populaciji Srbije i Crne Gore (15,7%) (275). Sa aspekta učestalosti rizičnog alela H63D u grupi ESRD, naši podaci su pokazali nižu učestalost u poređenju sa rezultatima Pelusi i sar. dobijenim na italijanskoj populaciji (10,7% vs 14,8%). Navedena razlika može delom biti objašnjena većom učestalošću koja je uočena u kontrolnoj grupi Pelusi i sar. u poređenju sa našom KG (19,2% vs 15%). Pri interpretaciji dobijenih rezultata neophodno je napomenuti da je veličina uzorka relativno mala, što može biti uzrok manje

statističke snage analize. Takođe, naša studija nije randomizovano kontrolisano istraživanje i bias selekcije pacijenata ne može biti isključen.

Niz studija je imalo za cilj ispitivanje povezanosti uobičajenih nehematoloških poremećaja sa frekvencijom varijanti u genu *TMPRSS6* i *HFE* (276-278). Poznavanje genetskih osnova poremećaja metabolizma gvožđa može biti od pomoći u otkrivanju drugih patofizioloških ili protektivnih mehanizama u humanim bolestima.

5.4. Analiza hematoloških parametara i indeksa, markera statusa gvožđa i inflamacije kod bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe

Bolesnici u ESRD i IDA grupi su imali klinički manifestnu anemiju sa približno istim koncentracijama Hgb (104,95 prema 103,00 g/L, $P = 0,776$) i HCT (0,32 prema 0,33, $P = 0,623$), koje su bile značajno niže od koncentracije Hgb (141,65 g/L) i HCT (0,42) u KG. U pogledu osnovnih hematoloških parametara MCV (93,88 prema 75,88 fL, $P < 0,001$), MCH (30,5 prema 24,5 pg, $P < 0,001$) i MCHC (323,2 prema 319,0 g/L, $P < 0,001$) su bili statistički značajno viši, dok su RBC (3,41 prema $4,23 \times 10^{12}/L$, $P < 0,001$) i RDW (15,0 prema 17,1%, $P < 0,001$) bili značajno niži u ESRD grupi u poređenju sa IDA grupom. Naši rezultati su očekivani imajući u vidu različite mehanizme u patofiziologiji inflamatorne i sideropenijske anemije. Dobro je poznata činjenica da primarni nedostatak gvožđa dovodi do sideropenijske anemije u kojoj dolazi do sinteze hipohromnih, mikrocitnih eritrocita (176), dok sa druge strane inflamatorna anemija ima karakteristike normocitne normohromne anemije (68). U poređenju sa zdravim ispitanicima, bolesnici u ESRD su imali značajno niže vrednosti RBC (3,41 prema $4,72 \times 10^{12}/L$, $P < 0,001$), MCHC (323,2 prema 333,6 g/L, $P < 0,001$), MCV (93,88 prema 88,90 fL) i RDW (15,0 prema 13,2%). Kada je u pitanju grupa IDA, MCH (24,5 prema 29,5 pg) i MCHC (319,0 prema 333,6 g/L) su bili značajno niži u odnosu na KG. Vrednosti hematoloških parametara kao i razlike nađene u našoj studiji se slažu sa istraživanjem Urrechaga i sar. koje je uključilo 102 bolesnika sa HBS, 86 ispitanika sa IDA i 120 zdravih osoba (279), kao i sa istraživanjem Urrechaga i sar. (280) sprovedenom na populaciji od 71 bolesnika sa CKD, 58 sa IDA i 120 zdravih ispitanika (280).

%HYPO i LHD% predstavljaju nove hematološke parametre određene na različitim platformama hematoloških analizatora, čije vrednosti daju informaciju o hemoglobinizaciji

eritrocita, tj. raspoloživosti gvožđa za potrebe eritropoeze u proteklih 90 – 120 dana (204, 279). U našoj studiji zabeleženi su statistički značajno viši %HYPO i LHD% u IDA grupi u poređenju sa ESRD (1,9 prema 19,1% za %HYPO i 12,4 prema 17,6% za LHD%, $P < 0,001$) i KG (0,2% za %HYPO i 4,9% za LHD%, $P < 0,001$), i statistički značajno viši u ESRD u odnosu na KG (1,9 prema 0,2% za %HYPO i 12,4 prema 4,9% za LHD%, $P < 0,001$). Određene vrednosti %HYPO i LHD% kao i razlike između ispitivanih grupa su u skladu sa rezultatima ispitivanja Urrechaga i sar. (280) koje je obuhvatilo 85 bolesnika sa ACD, 110 sa IDA i grupu od 90 zdravih osoba, u cilju utvrđivanja dijagnostičkih karakteristika LHD% kao potencijalnog markera funkcionalnog deficita gvožđa (280).

Retikulocitni indeks IRF predstavlja nezrelu formu retikulocita u čijem sastavu se nalazi najveća količina RNK. Smatra se da je sinteza IRF povišena u uslovima stimulisane eritropoeze, kao što su krvarenje, hemoliza ili u odgovoru na primenu gvožđa ili ESAs, kao i kod anemije zbog deficita gvožđa. Imajući u vidu da se IRF pojavljuje u cirkulaciji nekoliko dana pre retikulocita, IRF se smatra ranim indikatorom odgovora na terapiju anemije gvožđem ili ESAs (281). U našem istraživanju ustanovili smo statistički značajno ($P = 0,004$) više vrednosti IRF u ESRD ($0,33 \pm 0,09$) i IDA ($0,38 \pm 0,08$) grupi u poređenju sa KG ($0,27 \pm 0,05$), dok se grupe ESRD i IDA nisu značajno razlikovale. U prilog našim rezultatima govore i rezultati Schoorl i sar. (282) koji su takođe utvrdili značajno više vrednosti IRF kod bolesnika u ESRD lečenih HD i grupi sa IDA u odnosu na kontrolnu grupu, uz odsustvo značajne razlike između HD i IDA grupe (282).

Sadržaj hemoglobina u retikulocitu je u našem istraživanju određivan na hematološkim analizatorima različitih proizvođača (CHr – Siemens i RSf – Beckman Coulter). Literaturni podaci govore da i pored razlika u određivanju CHr i RSf dobro koreliraju i obezbeđuju istu kliničku informaciju u realnom vremenu (48 sati) o nedavnoj funkcionalnoj raspoloživosti gvožđa za eritroidne prekurzore, odnosno omogućuju direktnu procenu inkorporacije gvožđa u hemoglobin (200, 203, 205, 209). Dobijeni rezultati u našem ispitivanju su pokazali da je sadržaj hemoglobina u retikulocitu, određen parametrom CHr, bio značajno viši u ESRD [$32,0$ ($31,0-33,4$) pg] i KG grupi [$32,9$ ($32,0-34,0$) pg] u poređenju sa IDA [$25,0$ ($23,0-27,0$) pg] ($P < 0,001$). Isti zaključak je utvrđen pri poređenju vrednosti RSf u ESRD ($103,8 \pm 6,1$ pg) i KG grupi ($96,6 \pm 5,8$ pg) u poređenju sa IDA grupom ($89,2 \pm 4,4$ pg) ($P < 0,001$). Naši rezultati se slažu sa podacima Urrechaga i sar. (280) koji su utvrdili vrednost CHr (RSf) od $31,6 \pm 3,5$ ($110,6 \pm 8,7$ pg) kod bolesnika sa HBS, $33,2 \pm 1,6$ pg ($100,9 \pm 5,3$ pg) u kontrolnoj grupi i $24,5 \pm 3,4$ ($88,1 \pm 7,8$ pg) u IDA, i utvrdili statistički značajno niže CHr i RSf u IDA u poređenju sa

HBS i KG (280). Dobijeni rezultati su očekivani, imajući u vidu da je u IDA eritroidnim prekurzorima na raspolaganju smanjena količina gvožđa, što vodi redukovanoj sintezi hemoglobina i rezultuje nižim CHr (RSf). Sa druge strane, viši CHr i RSf u KG i ESRD u poređenju sa IDA odražavaju fiziološku odnosno normalizovanu hemoglobinizaciju eritrocita usled terapije (212).

Dobro je poznata činjenica da primarni nedostatak gvožđa dovodi do sideropenijske anemije koju odlikuju niska koncentracija gvožđa u serumu i visok ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (posledica povećane sinteze transferina), snižena saturacija transferina i veoma niska koncentracija feritina. Sa druge strane, kod anemije hronične bolesti je niska ili nisko normalna koncentracija serumskog gvožđa, snižen ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (zbog transferina kao negativnog reaktanta akutne faze), normalna saturacija transferina i normalna ili povišena koncentracija feritina (10, 68, 133, 179, 198). U našem istraživanju nađena je značajno viša koncentracija hsCRP kod bolesnika u ESRD u odnosu na IDA (2,70 prema 1,20 mg/L, $P < 0,001$) i KG (0,70 mg/L, $P < 0,001$), što je pokazatelj hronične inflamacije kod pacijenata u ESRD. Naši rezultati pokazuju da su pacijenti u ESRD [11,9 (9,85 – 15,55) $\mu\text{mol/L}$] i IDA grupi [6,00 (3,90 – 9,90) $\mu\text{mol/L}$] imali značajno niže koncentracije serumskog gvožđa od KG [17,6 (14,3 – 20,1) $\mu\text{mol/L}$], i značajno više u ESRD u odnosu na IDA grupu. Bolesnici u ESRD grupi su imali značajno niže vrednosti TIBC i transferina u poređenju sa IDA i KG, dok su vrednosti ovih parametara u IDA grupi bile više nego u KG. Značajno niže vrednosti TSAT i više sTfR su utvrđene kod IDA u poređenju sa ESRD i KG. Sve grupe su se razlikovale prema koncentraciji feritina, pri čemu je najviša koncentracija utvrđena u ESRD [256,70 (81,35 – 593,15) $\mu\text{g/L}$], a najniža u IDA grupi [8,00 (8,00 – 8,50) $\mu\text{g/L}$]. Određene razlike u profilu statusa gvožđa i inflamacije su očekivani i u skladu su sa prethodno navedenim specifičnim razlikama između sideropenijske i anemije hronične bolesti. Nađeni rezultati i dobijene razlike se slažu sa podacima objavljenim od strane Urrechaga i sar. (283) i Thomas i sar. (270).

5.5. Analiza koncentracije hepcidina-25, hematoloških parametara i indeksa, markera statusa gvožđa i inflamacije kod ESRD-D i ESRD-PD bolesnika

Koncentracija hepcidina-25 nije se statistički značajno razlikovala između bolesnika u ESRD lečenih hemodijalizom (ESRD-D) i predijaliznih bolesnika u ESRD (ESRD-PD) [53,01 (15,08-100,91) prema 59,26 (36,52-124,27) $\mu\text{g/L}$, $P = 0,645$]. Iako do sada nema istraživanja koja su za cilj imala ispitivanje razlika u pogledu koncentracije hepcidina-25 između ESRD-D

i ESRD-PD grupe, imajući u vidu da su bolesnici ESRD-D i ESRD-PD grupe stadijum 5 (eGFR < 15 mL/min/1,73 m²) i da ispitivanje Kuragano i sar. (250) sprovedeno na 198 HD bolesnika govori u prilog da se koncentracija hepcidina-25 nakon prvobitnog sniženja usled dijaliznog tretmana vraća na početne vrednosti nakon 1 sata, može se zaključiti da su rezultati našeg istraživanja očekivani.

Bolesnici u grupi ESRD-D su imali statistički značajno više vrednosti MCV (94,4 prema 90,8 fL, $P < 0,001$), RDW (15,2 prema 14,4%, $P = 0,003$) i značajno niži MCHC (322 prema 344 g/L, $P < 0,001$) u odnosu na ESRD-PD grupu, dok se koncentracija Hgb nije značajno razlikovala između navedenih grupa (105,0 prema 101,8 g/L, $P = 0,631$).

Sa aspekta biohemijskih parametara, naši rezultati ukazuju na značajno više vrednosti feritina (316,7 vs 129,0 µg/L, $P = 0,024$) i značajno niže vrednosti TIBC (38,5 vs 47,2 µmol/L, $P < 0,001$) i transferina (1,65 vs 1,91 g/L, $P < 0,001$) u ESRD-D grupi u odnosu na grupu ESRD-PD. U pogledu novih hematoloških parametara, nađene su značajno više vrednosti %HYPO (2,4 vs 0,7%, $P < 0,001$), LHD% (13,68 vs 4,52%, $P < 0,001$), IRF (0,336 vs 0,245 g/L, $P < 0,001$), RSf (105,0 vs 100,4 fL, $P = 0,001$), MRV (116,0 vs 110,9 fL, $P = 0,010$) i HLR (0,50 vs 0,29 g/L, $P = 0,011$) u ESRD-D grupi u odnosu na grupu ESRD-PD.

Iako nema literaturnih podataka o razlikama između ESRD-D i ESRD-PD bolesnika, dobijeni rezultati u našoj studiji su očekivani i treba ih tumačiti u skladu sa razlikom u terapiji anemije i dijaliznom tretmanu bolesnika ESRD-D u odnosu na ESRD-PD grupu. Naime, bolesnici u ESRD-PD grupi osim što nisu bili pod uticajem dijaliznog tretmana, nisu bili ni na terapiji ESAs ni *i.v.* gvoždem. Literaturni podaci ukazuju da bolesnici u ESRD na HD imaju viši prosečan dnevni gubitak gvožđa krvarenjem u gastrointestinalnom sistemu (6,27 vs 3,15 mL) u odnosu na bolesnike u predijaliznom stadijumu ESRD (184, 185). Takođe, bolesnici u ESRD na HD gube gvožđe zbog same HD procedure i usled česte venepunkcije, a imaju veće potrebe za gvoždem zbog stimulisane eritropoeze pri terapiji ESAs. Deficit gvožđa, apsolutni ili funkcionalni, može objasniti više vrednosti %HYPO, LHD% i MRV i niži MCHC kod bolesnika u ESRD-D grupi (200, 206). Sa druge strane, više vrednosti feritina, RSf, MCV i RDW i niže vrednosti TIBC i transferina mogu delom ukazati na efekte terapije *i.v.* gvoždem u cilju popunjavanja i održavanja telesnih rezervi radi obezbeđivanja dovoljne količine gvožđa za potrebe eritropoeze. IRF i HLR predstavljaju parametre koji opisuju nezrele prekurzore retikulocita sa najvećim sadržajem RNK (281). Literaturni podaci govore u prilog povišenih vrednosti mladih frakcija retikulocita pri stimulisanoj eritropoezi primenom ESAs i pri terapiji *i.v.* gvoždem (206). Imajući u vidu da u odnosu na ESRD-D grupu, bolesnici ESRD-PD grupi

nisu bili ni na terapiji ESAs ni *i.v.* gvožđem, zabeležene više vrednosti IRF i HLR u ESRD-D grupi su očekivan rezultat.

5.6. Analiza prisustva anemije u grupi ESRD bolesnika

Na osnovu koncentracije hemoglobina grupa ESRD je podeljena na grupu anemičnih bolesnika (ESRD-A) i grupu bez anemije (ESRD-NA). U cilju smanjenja uticaja inflamacije, analiziranjem nije obuhvaćeno 7 bolesnika kod kojih je vrednost hsCRP bila viša od 50 mg/L. Anemični bolesnici u ESRD grupi su imali značajno više vrednosti hepcidina-25 (55,28 prema 33,86 µg/L, $P = 0,039$) i feritina (256,7 prema 137,2 µg/L, $P = 0,020$), i značajno niže vrednosti RBC (3,31 prema 3,95 $10^{12}/L$, $P < 0,001$), HCT (0,31 prema 0,37, $P < 0,001$), TIBC (40,1 prema 43,8 µmol/L, $P = 0,048$), sTfR (1,18 prema 1,55 mg/L, $P = 0,001$) i Maf (94,2 prema 113,7, $P < 0,001$) u poređenju sa bolesnicima u ESRD bez anemije. Uočene razlike su bile značajne i nakon eliminacije uticaja starosti i pola. Nakon uklanjanja uticaja feritina, utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije značajno razlikovala između ESRD-A i ESRD-NA grupe.

Imajući u vidu da je nadoknada i održavanje rezervi gvožđa jedan od osnova terapije anemije u ESRD, navedene razlike između ESRD-A i ESRD-NA grupe treba posmatrati u okviru pomenute terapije. Viša koncentracija feritina u ESRD-A je očekivan rezultat i u skladu je sa preporukama primenjenih vodiča za terapiju anemije (172, 173). Pored više koncentracije feritina, niže vrednosti TIBC idu u prilog poremećenom metabolizmu gvožđa, koji je karakteristika anemije u inflamaciji. Razlika u koncentraciji hepcidina-25 između ESRD-A i ESRD-NA bila je statistički značajna, međutim, utvrđeno je da je ona posledica interindividualnih varijacija u koncentraciji feritina u ESRD-A grupi. Iako se koncentracija feritina može objasniti ushodnom regulacijom koja je povezana sa količinom deponovanog gvožđa i inflamacijom, koji dovode do stimulacije sinteze hepcidina-25 (11), ta uzročno posledična veza se ne može se sa sigurnošću utvrditi imajući u vidu dizajn naše studije.

Mikrocitni anemija faktor (Maf) je novi eritrocitni indeks koji odražava promene u veličini eritrocita i koncentraciji Hgb. Izračunava se prema jednačini: $Maf = ((Hgb \times MCV) / 100)$. Imajući na umu da je koncentracija hemoglobina u osnovi jednačine za izračunavanje indeksa Maf, utvrđena statistički značajna razlika između grupa ESRD-A i ESRD-NA (94,2 vs 113,7, $P < 0,001$) je očekivan rezultat i direktna posledica razlika u koncentraciji Hgb ESRD-A i ESRD-NA grupe. Rezultati Maf određeni u našoj studiji se slažu sa podacima objavljenim od Urrechaga i sar. (283) koji su kod 71 bolesnika sa HBS utvrdili vrednost Maf od 112 (88 – 138).

5.7. Analiza anemije hronične bolesti sa i bez deficita gvožđa kod bolesnika u ESRD

U cilju ispitivanja deficita gvožđa u anemiji hronične bolesti, anemični bolesnici u ESRD su klasifikovani primenom Thomasovog dijagnostičkog dijagrama. U osnovi Thomasovog algoritma nalazi se simultana primena indeksa sTfR/log feritin i sadržaja hemoglobina u retikulocitu (CHr). Granične vrednosti feritinskog indeksa zavise od proizvođača testa i inflamacije i u našem istraživanju vrednost $> 0,8$ (za hsCRP > 5 mg/L) tj. $> 1,5$ (ukoliko je hsCRP ≤ 5 mg/L) govore u prilog nedovoljne količine gvožđa za potrebe eritropoeze, tj. da je neophodno primeniti terapiju gvožđem u cilju povećanja telesnih rezervi. Granična vrednost CHr < 29 pg govori o neadekvatnoj raspoloživosti gvožđa za ugradnju u eritrocitne prekurzore i ukazuje na apsolutni ili funkcionalni deficit (213). Praktična primena Thomasovog dijagnostičkog dijagrama se ogleda u klasifikaciji pacijenata u cilju adekvatnog terapijskog pristupa, tj. identifikaciji pacijenata kojima je potrebno uvesti terapiju gvožđa, ESAs ili kombinovane terapije. Kod bolesnika na terapiji ESAs Thomasov algoritam može dati važne informacije pri praćenju eritropoetske aktivnosti, funkcionalnog deficita gvožđa i adekvatne količine gvožđa za ugradnju u nove eritrocite. Thomasov dijagnostički dijagram predstavlja model za razlikovanje različitih faza deficita gvožđa i predikciju pacijenata koji će odgovoriti na terapiju ESAs (197, 213).

Rezultati Thomasovog dijagrama pokazuju da je anemija bez deficita gvožđa (ACD) nađena kod 72 bolesnika ESRD-A grupe, dok je deficit gvožđa (ID) bio prisutan kod 8 bolesnika. Kod dva bolesnika sa ACD-ID je bila uvedena terapija *i.v.* gvožđem, pri čemu je jedan pacijent imao funkcionalni deficit i primao ESAs. Kod 6 bolesnika sa ACD-ID treba uvesti terapiju *i.v.* gvožđa. Bolesnici sa ACD na terapiji ESAs su imali adekvatno popunjene depoe gvožđa i TSAT, tj. medijana koncentracije feritina i TSAT kod bolesnika bez terapije *i.v.* gvožđem su bili 582,3 $\mu\text{g/L}$ i 33,3%, a na terapiji *i.v.* gvožđem 522,9 $\mu\text{g/L}$ i 33,1% (172), međutim kod ovih bolesnika se dovodi u pitanje efikasnost terapije imajući u vidu da im je koncentracija hemoglobina i dalje bila niža od ciljne 110 g/L. Pet bolesnika bez terapije ESAs je bilo na terapiji *i.v.* gvožđem jer im je TSAT $< 30\%$ i feritin < 500 $\mu\text{g/L}$, dok je 17 bolesnika bilo bez terapije *i.v.* gvožđem imajući u vidu da im je medijana TSAT bila 32,4%, iako im je medijana feritina bila 96,6 $\mu\text{g/L}$.

Thomasov dijagnostički dijagram smo primenili i na grupi bolesnika u ESRD u predijaliznom stadijumu koji nisu bili na terapiji anemije *i.v.* gvožđem ni ESAs. Od ukupno 23 bolesnika, 10 je bilo anemično. U I kvadrantu (ACD) je klasifikovano 7 bolesnika, dok su 3

bolesnika selektovana u II kvadrant (latentni nedostatak gvožđa). Bolesnicima sa latentnim nedostatkom gvožđa je preporučena terapija oralnim preparatima gvožđa. Kod bolesnika koji ne podnose dobro terapiju oralnim preparatima gvožđa ili imaju neadekvatan odgovor, preporučena je primena *i.v.* gvožđa. Odluka o terapiji oralnim vs *i.v.* gvožđem treba biti donesena u odnosu na stepen deficita gvožđa, prethodno zabeležene neželjene efekte terapije, prisustvo venskog pristupa i početak terapije ESAs (173).

5.8. Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa terapijom *i.v.* gvožđa i/ili ESAs

Grupu od 103 pacijenta na dijalizi podelili smo u 4 podgrupe na osnovu primenjene terapije ESAs i *i.v.* gvožđa: bolesnici lečeni ESAs, bolesnici lečeni ESAs i *i.v.* gvožđem, bolesnici na terapiji *i.v.* gvožđem i bolesnici koji nisu bili na terapiji ESAs ni *i.v.* gvožđem. Pre utvrđivanja povezanosti koncentracije hepcidina-25 sa primenom *i.v.* gvožđa i/ili ESAs, i ispitivanja korelacije sa hematološkim parametrima, markerima statusa gvožđa i inflamacije, utvrdili smo razlike između grupa između biohemijskih i hematoloških parametara.

Statistički značajna razlika između grupa nađena je prema koncentraciji hepcidina-25, feritina i TSAT (Tabela 39 poglavlje Rezultati). Kada su u pitanju hematološki parametri utvrđena je statistički značajna razlika prema vrednostima %HYPO, RBC, Hgb, HCT, IRF i Maf (Tabela 38 i 40, poglavlje Rezultati). Koncentracije hepcidina-25 i feritina su bile značajno više, a vrednosti parametara Hgb, HCT i Maf značajno niže kod bolesnika na terapiji ESAs i kombinovanoj terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike na terapiji *i.v.* gvožđem.

Do sada se mali broj istraživača bavio povezanošću terapije ESAs i *i.v.* gvožđa sa koncentracijom hepcidina-25, vrednostima hematoloških parametara, statusom gvožđa i stepenom inflamacije (241). Na malom broju ispitanika, Weiss i sar. su zaključili da između bolesnika koji su primali samo terapiju ESAs, samo terapiju *i.v.* gvožđa i udruženu terapiju ESAs i *i.v.* gvožđa ne postoji razlika u vrednostima hepcidina-25 pre dijaliznog tretmana. Isti zaključak je izveden i kada je u pitanju koncentracija feritina i CRP (241). Razlike u rezultatima dobijenih u istraživanju Weiss i sar. i naše analize mogu biti delom objašnjene značajnom razlikom u količini deponovanog gvožđa kod bolesnika na izolovanoj terapiji *i.v.* gvožđem u našoj [105,55 (47,90 – 384,15) µg/L] i studiji Weiss i sar. (419 ± 90 µg/L). Imajući u vidu da su prema primenjenim preporukama vodiča za terapiju anemije u sklopu HBS (171-173) jedan od preduslova za uvođenje terapije ESAs popunjeni depoi gvožđa, više vrednosti feritina kod

bolesnika na terapiji ESAs u odnosu na ostale ispitanike je očekivan rezultat. Budući da se grupe nisu razlikovale prema stepenu inflamacije, razlike u koncentraciji hepcidina-25 su očekivano pratile razlike u nivoima feritina.

Prema smernicama KDIGO, KDOQI i UKRA vodiča (171-173), a kako je i pomenuto u ranijem tekstu, koncentracija hemoglobina predstavlja osnovni kriterijum u donošenju odluke o primeni terapije ESAs kod bolesnika u ESRD. Posle veoma značajanih velikih multicentričnih, randomiziranih studija kao što su CREAT (227), CHOIR (228) i TREAT (229), normalizacija koncentracije Hgb sa visokim dozama ESAs se dovodi u vezu sa povećanim rizikom od morbiditeta i mortaliteta populacije bolesnika sa HBS. Rezultat navedenih činjenica je doveo do uvođenja nižih ciljnih vrednosti Hgb sa preporučenim opsegom između 100 – 120 g/L (173). Time se mogu delom objasniti niža koncentracija hemoglobina kod bolesnika na terapiji ESAs (sa ili bez *i.v.* gvožđa) u odnosu na bolesnike bez primene ESAs, a klasifikovane na osnovu primene *i.v.* gvožđa.

Bolesnici na terapiji *i.v.* gvožđem imali su statistički značajno niže vrednosti TSAT u poređenju sa bolesnicima na terapiji ESAs (25,42 vs 33,27%), bolesnicima na kombinovanoj terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem (25,42 vs 30,39%) i grupom bez terapije ESAs i *i.v.* gvožđem (25,42 vs 32,68%). I pored značajnog uticaja nutricionog statusa, vremena uzorkovanja, inflamacije, infekcije i interindividualne varijacije (233) TSAT je, pored feritina, najčešće korišćen marker za procenu statusa gvožđa kod bolesnika sa HBS (172). Kod bolesnika u ESRD terapija gvožđem ima potencijal da doprinese povećanju koncentracije Hgb ili sniženju doze ESAs kada je TSAT \leq 30% (284). Dokazi koji stoje iza tvrdnje da TSAT treba da se održava na vrednosti većoj od 20% proizilaze iz randomizovane kontrolisane studije upoređivanja viših i nižih ciljnih TSAT. Naime, pacijenti randomizirani na ciljni TSAT od 30% do 50% pokazali su smanjenje doze ESAs od 40% u poređenju sa ciljnim TSAT od 20% do 30% (284). Rezultati dobijeni u našoj studiji su očekivani uzimajući u obzir da je grupa koja je bila na terapiji samo *i.v.* gvožđem imala TSAT manji od 30%, tj. indikaciju za primenu *i.v.* gvožđa.

Utvrđene su značajno niže vrednosti parametra %HYPO u grupi bolesnika bez terapije u odnosu na ostale grupe. %HYPO predstavlja osetljiv marker za kvantifikaciju hemoglobinizacije zrelih eritrocita, odnosno procenu dovoljne količine gvožđa na raspolaganju za eritropoezu. Zbog dugog poluživota eritrocita u cirkulaciji %HYPO odražava status gvožđa u poslednja 2 – 3 meseca i indikator je deficita (171, 173, 204). Imajući u vidu da je grupa bez

terapije imala niži stepen anemije, sa medijanom koncentracije hepcidina-25 u okviru 2,5 i 97,5 percentila vrednosti zdravih individua iste starosti (38), naši rezultati sugerišu da kod ovih ispitanika postoji homeostaza gvožđa pa nije potrebna nadoknada gvožđa ni stimulacija eritropoeze.

Parametar IRF je bio statistički značajno viši u grupi bolesnika na terapiji *i.v.* gvoždem u odnosu na bolesnike bez terapije (0,35 prema 0,30) i bolesnike na terapiji ESAs (0,35 prema 0,29) kao i kod bolesnika na terapiji ESAs i *i.v.* gvoždem u odnosu na bolesnike na terapiji ESAs (0,37 prema 0,29). IRF je retikulocitni indeks koji predstavlja mladu formu retikulocita sa najvećom količinom RNK. Smatra se da IRF predstavlja rani i osetljivi marker eritropoetske aktivnosti, jer pozitivno korelira sa apsolutnim brojem retikulocita i povezan je sa povećanom eritropoezom (200, 206, 281). Prethodno publikovani radovi govore u prilog da pored stimulacije eritropoeze primenom ESAs, terapija *i.v.* gvoždem dovodi do povećanja vrednosti IRF prvog dana, koja nastavlja da raste i dostiže maksimalnu vrednost petog dana (200). Imajući u vidu uticaj terapije na IRF, može se reći da su rezultati našeg istraživanja očekivani i u skladu sa dosadašnjim istraživanjima.

Prema primeni ESAs korišćena ESRD-D grupa od 103 bolesnika podeljena je na bolesnike koji su na ESAs terapiji (ESAs-th grupa), i na bolesnike koji su bez suplementacije ESAs tokom prethodnih 6 meseci (ESAs-n grupa). Mnogi autori su pokazali da je koncentracija hepcidina-25 povišena kod bolesnika u ESRD (244, 245), međutim literaturni podaci o faktorima povezanim sa koncentracijom hepcidina-25 kod bolesnika lečenih hroničnim programom HD podeljenih u grupe na osnovu primene ESAs su oprečni (242, 243, 245, 247, 248).

Rezultati naše studije ukazuju da je koncentracija hepcidina-25 bila značajno viša kod bolesnika na hroničnoj terapiji HD koji su primali ESAs, u poređenju sa bolesnicima kojima nije bila neophodna terapija ESAs [16,36 (10,01 – 65,98) vs 59,34 (35,73 – 109,54) $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$], a ova razlika je u potpunosti objašnjena varijabilitetom u koncentraciji feritina. Po prvi put u većoj grupi ESRD-D bolesnika nezavisnih od terapije ESAs, naši nalazi ukazuju da ova specifična grupa bolesnika najverovatnije poseduje očuvanu homeostazu gvožđa sa nižim stepenom anemije i vrednostima hepcidina-25 u opsegu koncentracija zdravih individua. Takođe, koncentracija hepcidina-25 nije bila povezana sa indeksom rezistencije na ESAs (ERI), dozom održavanja ESAs i *i.v.* gvožđa kod HD bolesnika, što je skladu sa dosadašnjim istraživanjem (241, 243-245).

Imajući na umu složenost patogeneze anemije u HBS, mnogi faktori imaju ulogu u njenom razvoju, a pored inflamacije i poremećene homeostaze gvožđa kao vodeći činilac se izdvaja relativni nedostatak eritropoetina. Upravo njegova supstitucija primenom agenasa stimulacije eritropoeze predstavlja osnovu lečenja anemije kod HD bolesnika (224, 285). Rezistencija na ESAs je značajan i učestao problem koji je povezan sa povećanom stopom smrtnosti kod bolesnika u ESRD lečenih HD (286). Poznavanje mehanizma dejstva hepcidina-25, neophodnu raspoloživost velike količine gvožđa za adekvatnu eritropoetsku aktivnost stimulisanu ESAs, značajan uticaj inflamacije na povišenu sintezu hepcidina-25, kao i činjenicu da je inflamacija kod HD bolesnika jedan od najznačajnijih faktora koji dovodi do rezistencije na ESAs (287), pretpostavlja se da povišene koncentracije hepcidina-25 mogu objasniti potrebu za višim dozama ESAs za postizanje ciljnih vrednosti Hgb kod HD bolesnika (243). Suprotno ovoj hipotezi, Kautz i sar. (138) smatraju administraciju ESAs primarnim signalom koji pokreće eritropoezu, a koja dovodi do oslobađanja medijatora eritroferona, što konačno doprinosi smanjenju koncentracije hepcidina-25 (138). Rezultati prethodno objavljenih studija koje su imale za cilj utvrđivanje povezanosti ESAs i hepcidina-25 na populaciji bolesnika u ESRD su neusaglašeni. Iako je nekoliko autora došlo do zaključka da povezanost između koncentracije hepcidina-25 i doze ESAs nije značajna (244, 245, 250, 287), Weiss i sar. i van der Putten i sar. (241, 248) su utvrdili smanjenu ekspresiju aktivne forme hepcidina, čija je koncentracija određena metodom masene spektrometrije (241, 248). Takođe, do sličnih zaključaka je došla i studija sprovedena od strane Ashby i sar. (242) koja je pokazala da ESAs dovodi do sniženja ukupne koncentracije hepcidina kod HD bolesnika. Pomenuta grupa autora je odredila ukupnu koncentraciju hepcidina korišćenjem radioimunoeseja (242). Različito od rezultata našeg istraživanja, a suprotno rezultatima studije Ashby i sar. (242), El Sewefy i sar. (249) su zaključili da je visoka koncentracija hepcidina prediktor slabog i neodgovarajućeg odgovora na primenu ESAs, pri čemu su koristili ELISA test za određivanje koncentracije ukupnog hepcidina (249). Značajne razlike između naših rezultata i zapažanja Ashby i sar. (242) i analize El Sewefy i sar. (249) mogu se delimično objasniti primenom različitih metoda kojima se određuje ukupni hepcidin ili bioaktivna izoforma hepcidina. U našem istraživanju smo koristili hemiluminiscentnu imunološku metodu koja omogućava specifično određivanje koncentracije bioaktivnog oblika hepcidina – hepcidina-25. Pored navedenih razloga, razlike u našim rezultatima u odnosu na gore pomenute studije mogu se pripisati i brznoj regulaciji ekspresije hepcidina nakon započinjanja tretmana ESAs. Naime, u studiji Takasawa i sar. (288) je pokazano da nakon početka primene ESAs dolazi do sniženja koncentracije hepcidina-25, koja se vraća na početne vrednosti nakon 18 sati. Weiss i sar. (241)

sproveli su istraživanje u grupi od 20 bolesnika na HD kojima je dve nedelje bila ukinuta ESAs i terapija *i.v.* gvoždem, a van der Putten i sar. (241, 248) su do svog zaključka došli istraživanjem na grupi bolesnika sa kardiorrenalnom insuficijencijom koji ranije nisu lečeni ESAs. U našoj studiji uzorci krvi su uzimani najmanje tri dana nakon poslednje primene ESAs u grupi HD bolesnika na terapiji održavanja ESAs, što bi moglo delom objasniti razlike u rezultatima naše i gore navedenih studija.

Iako nismo uspeli da utvrdimo povezanost između ESAs i koncentracije hepcidina-25, utvrđena je da pozitivna korelacija između doze ESAs sa eritropoetskom aktivnošću. Imajući u vidu da naši rezultati ukazuju na značajnu negativnu korelaciju eritropoetske aktivnosti i hepcidina-25, ne može se isključiti mogućnost da terapija ESAs utiče na koncentraciju hepcidina-25 na indirektan način putem „eritroidnih medijatora“ eritroferona i trombocitnog faktora rasta BB, koji su povezani sa stimulisanom eritropoezom i hipoksijom, a dovode do suprimiranja ekspresije *HAMP* gena (138, 139, 155).

U cilju detaljnije analize uticaja povišene koncentracije hepcidina-25 na potrebe za većim dozama ESAs u cilju postizanja ciljnih vrednosti Hgb, izračunali smo indeks rezistencije na ESAs (ERI) i ispitali povezanost sa koncentracijom hepcidina-25. Prema vrednostima ERI, bolesnici na terapiji ESAs su podeljeni na kvartile. Bolesnici u gornjem kvartilu definisanom kao $ERI > 11,62$ su okarakterisani kao rezistentni na ESAs, a za bolesnike u ostalim kvartilima je smatrano da je postignut adekvatan efekat terapije ESAs. Naši rezultati korelacione analize nisu ukazali na postojanje statistički značajne povezanosti koncentracije hepcidina-25 sa ERI ($r = 0,12$, $P = 0,330$), a takođe nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji hepcidina-25 između ESAs rezistentnih bolesnika i bolesnika kod kojih je postignut terapijski efekat pri primeni ESAs, a koji su prema postavljenom kriterijumu bili u prva tri kvartila [62,79 (35,73–104,45) $\mu\text{g/L}$ prema 57,06 (35,48–111,00) $\mu\text{g/L}$], $P = 0,926$). Mogući uzroci odsustva povezanosti hepcidina-25 i ERI mogu se objasniti na sledeći način: 1) ERI u velikoj meri zavisi od određenog vremenskog okvira tokom kojeg je procenjen i u tesnoj je vezi sa šemom doziranja ESAs, što može značajno uticati na vrednost ERI tokom perioda određivanja (289); 2) malog broja ispitanika, 3) ispitivani bolesnici su ispoljavali inflamaciju niskog stepena (289); i 4) naše ispitivanje u formi studije preseka može prikriti potencijalne uzročno-posledične veze između hepcidina-25, feritina, hsCRP, eritropoetske aktivnosti i preporučene dnevne doze ESAs.

U našem istraživanju nije utvrđena povezanost koncentracije hepcidina-25 sa vrstom (kratkodelujući ili dugodelujući) ESAs. Naši rezultati se razlikuju u odnosu na prethodno publikovan efekat koji različite vrste ESAs imaju na koncentraciju hepcidina-25. Shoji S i sar. (290) su došli do zaključka o većoj potentnosti darbepoetin- α (dugog dejstva) u odnosu na eritropoetin- β (kratkog dejstva) u sniženju koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika na HD (290). U pomenutom istraživanju sprovedenom na šest bolesnika koji su bili bez suplementacije gvoždem, utvrđeno je da dugodelujući i kratkodelujući ESAs smanjuju koncentraciju hepcidina-25 u krvi tokom prvih četiri dana, nakon čega su se vrednosti hepcidina-25 vratile na početni visok nivo (290). Imajući na umu da deponovano gvožđe i inflamacija ushodno regulišu koncentraciju hepcidina-25 (11), niži nivoi feritina u studiji Shoji S i sar. ($138,0 \pm 73,3 \mu\text{g/L}$) u poređenju sa vrednostima u našoj studiji [$421,4 (172,7-704,7) \mu\text{g/L}$], zatim odsustvo primene *i.v.* terapije gvoždem u studiji Shoji S. i sar. i karakteristične kratkotrajne varijacije u koncentraciji hepcidina-25 nakon početka primene ESAs (vraćanje na početne vrednosti nakon 18h) mogu delom objasniti razliku u rezultatima studije Shoji i sar. i našeg istraživanja (288, 290). Takođe, razlika u rezultatima naše i studije Shoji i sar. može biti objašnjena sa aspekta molekularnog mehanizma kojim stimulirana eritropoeza i deponovano gvožđe unakrsno regulišu sintezu hepcidina-25. Naime, regulacija ekspresije *HAMP* gena stimulisanom eritropoezom zavisi od funkcionalnog SMAD signalnog puta koji je sastavni deo BMP – SMAD signalne kaskade koja detektuje deponovano gvožđe (11). Smatra se da iako je sinteza ERFE povišena u stimuliranoj eritropoezi, njegova *in vivo* aktivnost je oslabljena kada je SMAD signalizacija veoma izražena (npr. u uslovima povećane količine deponovanog gvožđa) (141, 142).

Prilikom ispitivanja uticaja primene *i.v.* gvožđa na koncentraciju hepcidina-25 korelaciona analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost u grupi koja nije na terapiji ESAs ($r = 0,043$, $P = 0,794$), u grupi koja je na terapiji ESAs ($r = -0,046$, $P = 0,717$) i kod svih ispitivanih bolesnika ESRD-D grupe ($r = 0,05$, $P = 0,601$). Naši rezultati se slažu sa publikovanim rezultatima nekoliko studija (241, 245, 291, 292). Prethodno ispitivanje na zdravim osobama pokazalo je da jedna doza parenteralno primenjenog gvožđa izaziva dinamičan proces koji uključuje kratkotrajni porast koncentracije hepcidina-25 u vremenskom okviru od 24 časa (165). Malyszko i sar. (293) su našli povišene koncentracije hepcidina nakon *i.v.* terapije gvoždem u istraživanju sprovedenom na 12 HD bolesnika. Neusklađenost između naših nalaza i rezultata pomenute studije može se objasniti činjenicom da su Malyszko i sar. (293) koristili RIA test kojim su odredili koncentraciju ukupnog hepcidina. Takođe, bitan

podatak koji treba uzeti u obzir prilikom razmatranja razlika u dobijenim rezultatima je i dinamika primene *i.v.* gvožđa. Naime, u studiji Kemna i sar. (165) je ispitivanje na zdravim ispitanicima sprovedeno nakon primene prve doze *i.v.* gvožđa. U našem istraživanju je grupa bolesnika u ESRD na terapiji *i.v.* gvožđem kontinuirano primala terapiju, pri čemu su imali povišene koncentracije hepcidina-25. Nalazi dobijeni u našem istraživanju sugerišu da kod bolesnika u ESRD sa popunjenim rezervama gvožđa i povišenom koncentracijom hepcidina-25, dodatna parenteralna primena gvožđa ne indukuje značajno povećanje koncentracije hepcidina-25 (241).

Značajna pozitivna korelacija hepcidina-25 sa feritinom je utvrđena u gotovo u svim studijama kod bolesnika sa HBS, pa se feritin smatra najjačim prediktorom koncentracije hepcidina-25 (179, 241-246). Rezultati multiple regresione analize su pokazali da je hepcidin-25 pokazao najsnažniju povezanost sa koncentracijom feritina u kompletnoj ESRD-D grupi ($\beta = 0,778$, $P < 0,001$), u ESAs-th ($\beta = 0,677$, $P < 0,001$) i ESAs-n grupi ($\beta = 0,765$, $P < 0,001$). Dobijeni rezultati su očekivani imajući u vidu da su koncentracije hepcidina-25 i feritina ushodno regulisane višim telesnim rezervama gvožđa i inflamacijom (11, 294), i slažu se sa rezultatima prethodno publikovanih studija sprovedenih na HD bolesnicima (241, 243-245, 248, 250).

U našem istraživanju smo utvrdili približno 5 puta višu koncentraciju feritina u ESAs-th u poređenju sa ESAs-n grupom (421,4 vs 90,0 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$), pri čemu nije utvrđena razlika u stepenu inflamacije između ispitivanih grupa (3,0 vs 2,7 mg/L , $P = 0,989$). Naši rezultati se slažu sa podacima Touzot i sar. (247) koji su takođe utvrdili značajno više vrednosti feritina (312 ± 166 vs 183 ± 102 $\mu\text{g/L}$, $P = 0,001$) u ESAs-th u poređenju sa ESAs-n, pri čemu stepen inflamacije meren koncentracijom CRP nije bio značajno različit između grupa ($P = 0,584$). Značajno viša koncentracija feritina u ESAs-th grupi bolesnika je verovatno, pored uticaja osnovne bolesti, posledica terapije *i.v.* gvožđem (171, 172) u svrhu održavanja popunjenosti depoa gvožđa, tj. obezbeđivanja dovoljne količina gvožđa za potrebe stimulisane eritropoeze.

Koncentracija hepcidina-25 od 16,36 (10,01 – 65,98) $\mu\text{g/L}$ određena kod 39 HD bolesnika ESAs-n grupe bila je u opsegu vrednosti zdravih osoba iste starosti u istraživanju Galesloot i sar. (38) i približna koncentraciji $12,53 \pm 10,46$ $\mu\text{g/L}$ u studiji Touzot i sar. (247) na bolesnicima lečenih HD tretmanom bez terapije ESAs. Sa stanovišta metabolizma hepcidina-25 ova specifična grupa HD bolesnika nezavisna od terapije ESAs pokazuje naizgled

očuvanu homeostazu gvožđa sa nižim stepenom anemije. Naime, u grupi ESA-n nađene su značajno više vrednosti eritrocita ($3,82$ vs $3,35 \times 10^{12}/L$, $P < 0,001$), Hgb ($117,5$ vs $102,0$ g/L, $P < 0,001$), HCT ($0,36$ vs $0,32$, $P < 0,001$) i TIBC ($41,0$ vs $37,7$ $\mu\text{mol}/L$, $P = 0,046$) uz istovremeno niže koncentracije hepcidina-25 ($16,36$ vs $59,34$ $\mu\text{mol}/L$, $P < 0,001$) i feritina ($90,0$ vs $421,4$ $\mu\text{g}/L$, $P < 0,001$) u poređenju sa grupom ESA-th. Naši rezultati potvrđuju prethodne rezultate studije Touzot i sar. (247) na većoj grupi bolesnika nezavisnih od terapije ESAs. U istraživanju na 15 bolesnika na HD tretmanu nezavisnih od ESAs i 60 bolesnika na HD sa stabilnom dozom ESAs i koncentracijom Hgb, nađene su značajno više vrednosti eritrocita, koncentracije Hgb, HCT i TIBC i značajno niže koncentracije hepcidina-25 i feritina kod HD bolesnika bez terapije ESAs u poređenju sa bolesnicima na terapiji ESAs.

Poznato je da anemija ima značajan negativni uticaj na ekspresiju hepcidina-25 (29, 42, 68), a utvrđena statistički značajna inverzna korelacija između hepcidina-25 i RBC ($r = -0,366$, $P = 0,022$) i Hgb ($r = -0,271$, $P = 0,048$) u ESAs-n grupi je u skladu sa ovom tvrdnjom. Sa druge strane, odsustvo korelacije [RBC ($r = -0,141$, $P = 0,265$) i Hgb ($r = -0,129$, $P = 0,311$)] može ukazati da bi poremećena homeostaza gvožđa, primećena u ESAs-th grupi, potencijalno mogla da izmeni odnos anemije i hepcidina-25. Naši rezultati sugerišu da niže koncentracije hepcidina-25 u ESAs-n grupi mogu doprineti efikasnijem iskorišćavanju gvožđa za potrebe hematopoeze. Pri interpretaciji rezultata treba uzeti u obzir veći broj ispitanika u ESA-th grupi (64 vs 39). Nedavne studije su pokazale da sniženje koncentracije hepcidina-25 može biti od suštinskog značaja za efikasniju eritropoezu, što uliva nadu za buduću strategiju lečenja anemije povezane sa terminalnim stadijumom hronične bubrežne slabosti (237, 295).

Apsolutni broj retikulocita je hematološki parametar za procenu eritropoetske aktivnosti koštane srži (10, 206). Rezultati multiple regresione analize su ukazali na značajnu povezanost apsolutnog broja retikulocita i koncentracije hepcidina-25 u ESAs-th ($\beta = -0,199$, $P = 0,022$), ESAs-n ($\beta = -0,239$, $P = 0,008$) i kompletnoj grupi HD bolesnika ($\beta = -0,193$, $P = 0,001$). Rezultati dobijeni u našem istraživanju su u skladu sa rezultatima van der Weerd i sar. ($\beta = -0,034$, $P = 0,019$) (245) koji su dobijeni u studiji sprovedenoj na 405 HD bolesnika, a koji sugerišu da bi visoke koncentracije hepcidina-25 mogle da indukuju blokadu apsorpcije gvožđa i izlazak gvožđa iz makrofaga i hepatocita, što dovodi do eritropoeze sa ograničenom količinom gvožđa (68, 179, 296). Međutim, u našoj studiji nije utvrđena uzročno-posledična veza između hepcidina-25 i eritropoeze, i nije rešena dilema da li indukovana eritropoeza dovodi do suprimiranja sinteze hepcidina-25, ili obratno, da li nizak nivo hepcidina-25 doprinosi stimulisanoj eritropoezi.

Nemeth i sar. (72) ispitivali su povezanost inflamacije sa koncentracijom hepcidina u studiji koja je uključila 6 zdravih ispitanika. U navedenoj studiji je bilo statistički značajnog povećanja ($P < 0,001$) koncentracije hepcidina u urinu nakon 2 sata od infuzije IL-6, a koja se vraćala na prvobitne vrednosti nakon 24 sata. Ova grupa autora je takođe utvrdila da je tokom inflamacije sprega IL-6 – hepcidin odgovorna za hipoferemiju usled inflamacije (69, 72). U prilog povezanosti hepcidina-25 sa inflamacijom govore i rezultati ispitivanja dobijeni u našem istraživanju. Pearsonovom korelacionom analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između hepcidina-25 i inflamacije praćene koncentracijom hsCRP u kompletnoj ESRD-D grupi ($r = 0,256$, $P = 0,009$), ESAs-th ($r = 0,319$, $P = 0,010$) i ESA-n grupi ($r = 0,299$, $P = 0,032$). Uprkos činjenici da je hepcidin-25 prepoznat kao protein akutne faze (69, 72), rezultati multiple regresione analize su pokazali da se značajna povezanost sa inflamacijom, pored kompletne ESRD-D bolesnika ($\beta = 0,143$, $P = 0,010$), zadržala jedino u ESAs-th grupi ($\beta = 0,214$, $P = 0,016$). Prisustvo inflamacije je karakteristika bolesnika u ESRD i ključna karika mehanizma nastanka inflamatorne anemije (68, 133). Međutim, iako se smatra da je sinteza hepcidina-25 ushodno stimulisana u inflamaciji, literaturni podaci su neusaglašeni u pogledu odnosa koncentracije hepcidina-25 sa markerima inflamacije kod bolesnika lečenih HD. U odnosu na do sada objavljene podatke, rezultati istraživanja van der Weerd i sar. ($\beta = 0,012$, $P < 0,001$) (245), Pelussi i sar. ($\beta = 0,28$, $P = 0,010$) i Zaritsky i sar. ($\beta = 0,13$, $P = 0,006$) (246) su pokazali značajnu povezanost, dok sa druge strane, Ashby i sar. nisu uspeali da utvrde značajnu povezanost ($\beta = - 0,016$, $P = 0,874$) (242), a Kuragano i sar. ($r = 0,1$, $P = \text{NS}$) (250), Weiss i sar. ($r = - 0,126$, $P = 0,606$) (241), Touzot i sar. ($r = 0,18$, $P = 0,13$) (247), van der Putten i sar. ($r = 0,00$, $P = 0,19$) (248) i Kato i sar. ($r = 0,21$, $P = 0,33$) (243) nisu utvrdili značajnu korelaciju hepcidina sa markerima inflamacije.

5.9. Povezanost koncentracije hepcidina-25 sa apsolutnim brojem retikulocita, eritrocitnim i retikulocitnim indeksima kod bolesnika u ESRD

Ispitivanje povezanosti apsolutnog broja retikulocita, retikulocitnih i eritrocitnih indeksa sa koncentracijom hepcidina-25 sprovedeno je u grupi 80 anemičnih bolesnika u ESRD klasifikovanih prema procenjenom balansu statusa gvožđa. Nedavno publikovana multicentrična, randomizovana studija PIVOTAL (238) imala je za cilj ispitivanje bezbednosti i efikasnosti primene *i.v.* gvožđa na populaciji od 2141 HD bolesnika upoređujući reaktivnu strategiju relativno malim dozama *i.v.* gvožđa (kada je vrednost feritina bila $< 200 \mu\text{g/L}$ ili

TSAT < 20%) i proaktivnu strategiju primenom 600 mg *i.v.* gvožđa prvog meseca a zatim 400 mg svakog sledećeg meseca (kada su vrednosti feritina bile < 700 µg/L i TSAT < 40%) (238). Rezultati PIVOTAL studije su pokazali da je proaktivna administracija *i.v.* gvožđa bezbedna, superiornija u odnosu na reaktivni režim doziranja *i.v.* gvožđa, rezultira u sniženju primenjenih ESAs doza i poboljšava kliničke ishode HD bolesnika (značajno smanjen rizik od smrtnog ishoda ili velikih nefatalnih kardiovaskularnih događaja u poređenju sa reaktivnim režimom) (238).

Rezultati PIVOTAL studije su sa stanovišta bezbednih koncentracija feritina i TSAT, doveli do ažuriranja UKRA vodiča, pri čemu je gornja granica koncentracije feritina povišena sa dosadašnjih < 500 µg/L na preporučenih < 700 µg/L i TSAT sa < 30% na < 40% (173). Na osnovu procenjenog „balansa gvožđa“ tj. primenom navedenih ažuriranih graničnih vrednosti za pozitivni balans gvožđa i vrednosti feritina od 100 µg/L i TSAT od 20% za granicu apsolutnog deficita gvožđa, klasifikovali smo bolesnike na grupu sa pozitivnim balansom gvožđa (PB), adekvatnim statusom gvožđa (IS) i apsolutnim deficitom gvožđa (ID). Zatim smo ispitali razlike u koncentraciji hepcidina-25 i vrednostima indeksa eritrocita i retikulocita između formiranih grupa. Naši rezultati su pokazali da je koncentracija hepcidina-25 bila najviša u grupi sa pozitivnim balansom gvožđa i statistički značajno viša odnosu na grupu sa adekvatnim statusom gvožđa (72,78 vs 53,22 µg/L) i grupu sa negativnim balansom gvožđa (72,78 vs 12,25 µg/L). Dobijeni rezultati su očekivani imajući u vidu mehanizam pozitivne povratne sprege kojim deponovano gvožđe BMP – SMAD, i inflamacija JAK – STAT putem dovode do stimulacije, a deficit gvožđa inhibicijom BMP – SMAD puta do suprimiranja ekspresije *HAMP* gena (11, 23, 133). Nađena niska koncentracije hsCRP u ispitivanoj grupi anemičnih bolesnika u ESRD (2,45 mg/L) i odsustvo značajne razlike između grupa ID, IS i PB u pogledu koncentracije hsCRP ($P = 0,122$) upućuju na zaključak da je inflamacija bila niskog stepena, što sugerise da je koncentracija hepcidina-25 najvećim delom bila pod uticajem deponovanog gvožđa.

Imajući u vidu složenost metabolizma gvožđa jasno je da različiti mehanizmi imaju uticaj na sintezu hepcidina-25, a danas je pored deficita gvožđa kao značajni činilac negativne modulacije ekspresije hepcidina-25 identifikovana aktivna eritropoeza (11, 138, 155). Smatra se da u uslovima aktivne eritropoeze eritroblasti sintetišu hormon ERFE koji dovodi do odvajanja BMP2/6 receptora što rezultira suprimiranjem sinteze hepcidina (155). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je koncentracija hepcidina-25 [12,25 (4,63 – 20,43) µg/L] dobijena u grupi bolesnika u ESRD sa negativnim balansom gvožđa (ID) bila u okviru

referentnog opsega određenog od strane Galesloot i sar. na opštoj populaciji istih godina (2,5 – 97,5 percentil: 1,95 – 69,2 µg/L za žene i 2,23 – 60,54 µg/L za muškarce) (38). Dobijeni rezultati statistički značajne negativne korelacije između hepcidina-25 i deficita gvožđa, određenog nivoom %HYPO ($\rho = -0,475, P = 0,034$) i eritropoetske aktivnosti, koja se ogleda u vrednostima RET ($\rho = -0,446, P = 0,048$) i IRF ($\rho = -0,576, P = 0,010$) u grupi bolesnika u ESRD sa ID su očekivani i u skladu sa prethodno opisanim molekularnim mehanizmima kojima eritropoetska aktivnost i deficit gvožđa suprimiraju ekspresiju hepcidina-25 (11, 155). Smatra se da je ovaj mehanizam adaptivni i da se na ovaj način doprinosi boljoj apsorpciji i oslobađanju deponovanog gvožđa, a u cilju adekvatnijeg snabdevanja gvožđa za potrebe eritropoeze. Sa druge strane, utvrđena značajna negativna korelacija između hepcidina-25 i apsolutnog broja RET ($\rho = -0,371, P = 0,040$) u grupi bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa sugerise da povišene koncentracije hepcidina-25 posreduju u redukovanju raspoložive količine gvožđa, što bi moglo rezultirati suprimiranjem eritropoetske aktivnosti. U studiji van der Weerd i sar. koja je uključila 405 bolesnika lečenih HD nađena je značajna povezanost koncentracije hepcidina-25 i RET ($\beta = -0,034, P = 0,019$), a tome u prilog govore i rezultati ispitivanja sprovedeni u našem istraživanju.

CHr je sadržaj hemoglobina u retikulocitima određen na hematološkom analizatoru Advia 2120i (Siemens), i predstavlja osetljiv indikator eritropoeze u deficitu gvožđa. Smatra se pouzdanim dijagnostičkim alatom za direktnu procenu nedovoljne količine gvožđa za efikasnu eritropoezu. Dijagnostičke karakteristike CHr su doprinele da ovaj parametar bude ugrađen u NKF/KDOQI i UKRA vodiče (171, 173). CHr se određuje iz K₂EDTA uzorka krvi, a zbog kratkog životnog veka retikulocita, smatra se osetljivim markerom za procenu funkcionalne raspoloživosti gvožđa za eritriodne prekurzore u prethodna 2 – 3 dana (200, 203, 211). RSf (Beckman Coulter) je parametar koji, kao i CHr, predstavlja sadržaj hemoglobina u retikulocitima, obezbeđuje podatke o efikasnom snabdevanju gvožđa za potrebe eritropoeze u realnom vremenu i sa istim značenjem kao CHr (209). Dodatno, hepcidin-25 se smatra markerom koji odražava snabdevenost gvožđem za potrebe eritropoeze u realnom vremenu, jer se njegova koncentracija menja u roku od nekoliko časova prateći promene nivoa gvožđa (197). Osvrnuvši se na rezultate ove teze, odsustvo statistički značajne razlike u nivoima CHr ($P = 0,481$) i RSf ($P = 0,564$) između grupa i najviša koncentracija hepcidina-25 u grupi bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa mogu ukazivati na zaključak da su povišeni nivoi feritina i TSAT neophodni za očuvanje adekvatne snabdevenosti gvožđem za potrebe eritropoeze u cilju prevazilaženja retikuloendotelne blokade izazvane povišenim koncentracijama hepcidina-25

(185, 233). U prilog navedenoj hipotezi govore rezultati Tessitore i sar. (292) koji su ispitivali dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 u predviđanju odgovora na terapiju *i.v.* gvoždem u studiji sprovedenoj na 56 HD bolesnika na terapiji ESAs, kao i rezultati i Coyne i sar. (233), dobijenih na 134 HD bolesnika selektovanih iz randomizirane kontrolisane multicentrične DRIVE studije. Coyne i sar. (233) su imali za cilj procenu efikasnosti primene *i.v.* gvožđa kod pacijenata sa koncentracijom feritina od 500 do 1200 $\mu\text{g/L}$ i istovremenom $\text{TSAT} \leq 25\%$, a koji su i dalje bili anemični uprkos primeni adekvatnih doza ESAs. Zaključak navedenih studija je da *i.v.* terapija gvoždem kod pacijenata sa povišenom koncentracijom hepcidina, tj. feritina kao i CRP, može prevazići retikuloendotelnu blokadu gvožđa izazvanu povišenom koncentracijom hepcidina i eritropoezu sa ograničenom količinom gvožđa dovodeći do viših koncentracija Hgb.

Gvožđe ima dva suprotna efekta na eritropoezu: dopremanje gvožđa eritroidnim prekursorima direktno aktivira njihovu diferencijaciju, dok sa druge strane stimulacija sinteze hepcidina posredovana gvoždem i indukcija oksidativnog stresa indirektno dovode do inhibicije ove diferencijacije. Heparin ostvaruje osnovnu ulogu ne samo u homeostazi gvožđa i patogenezi anemije u ESRD, već i u komorbiditetima bolesnika u ESRD uključujući aterosklerozu i infekciju. Imajući u vidu da je sinteza hepcidina-25 najvećim delom stimulisana gvoždem, a u manjem stepenu inflamacijom, grupa autora Nakanishi i sar. (236) smatra da prepisivanje „prekomernih“ količina *i.v.* gvožđa treba biti dobro razmotreno od strane kliničara.

U našoj studiji ustanovili smo značajnu negativnu korelaciju koncentracije hepcidina-25 sa vrednostima CHr ($\beta = -0,493$, $P = 0,004$) i RSf ($\beta = -0,334$, $P = 0,036$), koja je nađena samo u grupi anemičnih pacijenata u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa. Dobijeni rezultati ukazuju da anemični pacijenti u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa mogu imati smanjenu bioraspoloživost gvožđa i povećani potencijal za eritropoezu sa ograničenom količinom gvožđa koja je posledica „zarobljenog“ gvožđa u skladištima usled povišene koncentracije hepcidina-25. Prethodno objavljene studije su identifikovale ulogu hepcidina-25 kao glavnog regulatora homeostaze gvožđa i kao ključnog medijatora poremećenog iskorišćavanja gvožđa (11, 23, 68, 133). Međutim, dosadašnji dokazi o ulozi hepcidina-25 u eritropoezi sa ograničenom količinom gvožđa su uglavnom indirektni i oslanjaju se na negativnu povezanost hepcidina-25 i koncentracije Hgb ili RET (245, 246, 268).

Iako je samo u grupi bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa nađena statistički značajna povezanost koncentracije hepcidina-25 sa CHr ($\beta = -0,493$, $P = 0,004$) i RSf ($\beta = -0,334$, $P = 0,036$), u kompletnoj grupi anemičnih bolesnika u ESRD nije nađena statistički značajna povezanost. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Thomas i sar. (270), i Eguchi i sar. (297), koji takođe nisu našli povezanost koncentracije hepcidina-25 sa sadržajem hemoglobina u retikulocitima i ovaj nalaz bi potencijalno mogao da navede na pogrešan zaključak da hepcidin-25 nije uključen u dinamiku metabolizma gvožđa u retikulocitima. Značajne razlike u utvrđenoj povezanosti hepcidina-25 sa sadržajem hemoglobina u retikulocitima dobijenoj u našoj PB grupi i odsustvo ove veze opisane u studijama Thomas i sar. (270) i Eguchi i sar. (297) bi se u određenoj meri mogle pripisati različitom načinu odabira anemičnih pacijenata. Naime, u interpretaciji uočenih razlika u dobijenim rezultatima treba uzeti u obzir sledeće činjenice: Thomas i sar. (270) su sprovedli istraživanje na populaciji bolesnika sa različitim etiologijom anemije, dok su Eguchi i sar. (297) sprovedli studiju na bolesnicima lečenih peritonealnom dijalizom. Sa druge strane, u nedavno objavljenoj studiji od strane Ogawa i sar. (205), utvrđena je negativna korelacija koncentracije hepcidina-25 i nivoa CHr kod HD bolesnika sa statusom gvožđa ekvivalentnim koncentraciji hepcidina-25 iznad $70 \mu\text{g/L}$ (205). U prilog rezultata studije Ogawa i sar. (205) govore i rezultati naše studije, a koji upućuju na zaključak da povezanost hepcidina-25 i sadržaja hemoglobina u retikulocitima zavisi od balansa statusa gvožđa.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je hepcidin-25 imao prihvatljive dijagnostičke karakteristike ($\text{AUC} = 0,808$) u diferencijaciji anemičnih ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa od ostalih anemičnih ESRD bolesnika. Takođe, dokumentovana je relativno dobra specifičnost od 75,5%, prihvatljiva osetljivost od 61,3% i optimalna granična vrednost za hepcidin-25 od $66,13 \mu\text{g/L}$ za gornji nivo adekvatnog statusa gvožđa. Utvrđeno je da hepcidin-25 ima negativnu prediktivnu vrednost, što govori da koncentracija hepcidina-25 niža od $66,13 \mu\text{g/L}$ isključuje pozitivni balans gvožđa. Uzimajući u obzir da je ekspresija hepcidina-25 ushodno regulisana deponovanim gvožđem i inflamacijom (11), očekivano je da povišene koncentracije hepcidina-25 budu povezane sa povišenom koncentracijom feritina, tj. rizikom od opterećenja gvožđa. Usled prekomerne primene *i.v.* gvožđa, značajan deo aplikovanog gvožđa biva uskladišten u retikuloendotelnom sistemu i makrofagama jetre (11, 298). Jedan od hipotetičkih mehanizama razvoja eritropoeze sa ograničenom količinom gvožđa jeste indukcija sinteze hepcidina-25 mehanizmom pozitivne povratne sprege od strane

prekomerne količine uskladištenog gvožđa u jetri, pri čemu dolazi do uspostavljanja začaranog kruga (11, 21, 73).

Optimalna granična vrednost za hepcidin-25 utvrđena u ovom istraživanju približna je nedavno publikovanoj vrednosti od 70 $\mu\text{g/L}$ u radu Ogawa i sar. (205) iznad koje se razvija negativan metabolizam gvožđa za eritropoezu. U svom istraživanju, Ogawa i sar. su odredili koncentraciju hepcidina-25 korišćenjem masene spektrometrije u grupi bolesnika na HD (205). Takođe, naši rezultati su približni onima koje su nedavno objavili Rostoker i sar. (298), a koji su koristili ELISA test za određivanje koncentracije hepcidina-25. U istraživanju sprovedenom na 212 HD bolesnika, Rostoker i sar. su utvrdili optimalnu graničnu vrednost hepcidina-25 od 66,81 $\mu\text{g/L}$ i dokumentovali dobre dijagnostičke karakteristike u detekciji opterećenja gvožđem (298). Specifičnost hepcidina-25 kao markera pozitivnog balansa gvožđa može se objasniti njegovom ulogom u fiziološkom mehanizmu odbrane kojim: a) sprečava preuzimanje NTBI gvožđa (*eng. non-transferrin-bound iron*, NTBI) od strane nepoželjnih patogena (299) i b) štiti od citotoksičnog dejstva posredovanog NTBI (234). Smatra se da hepcidin određuje stepen i dužinu trajanja stanja sa ograničenom količinom gvožđa raspoloživim za eritropoezu (42, 300). Prilikom razmatranja zaštitne uloge hepcidina, važno je imati u vidu da je navedena funkcija urođenog imuniteta protektivna samo u kratkom vremenskom intervalu u kome obezbeđuje formu „nutricionog imuniteta“. Sa druge strane, smanjena dostupnost gvožđa u dužem vremenskom periodu može biti štetna za organizam (301).

Rezultati istraživanja pokazuju da je povišena koncentracija hepcidina-25 bila značajno povezana sa smanjenom funkcionalnom raspoloživošću gvožđa za sintezu hemoglobina koja je određena nivoima CHr (RSf) u grupi bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa. Zatim, hepcidin-25 je negativno korelirao sa nedostatkom gvožđa (određenim nivoom %HYPO) i slična povezanost sa aktivnom eritropoezom (određena vrednostima RET i IRF) je identifikovana kod ESRD bolesnika sa apsolutnim deficitom gvožđa. Najzad, naša studija ukazuje da granična vrednost hepcidina-25 od 66,13 $\mu\text{g/L}$ ima prihvatljive dijagnostičke karakteristike u isključivanju pozitivnog balansa gvožđa.

Mogućnost procene pozitivnog balansa gvožđa korišćenjem hepcidina-25 je obećavajući, međutim pre uspešne implementacije ovog testa u rutinsku kliničku praksu potrebno je ukazati na nekoliko ograničenja. Za određivanje hepcidina koriste se različite metode, što komplikuje interpretaciju rezultata. Harmonizacija i standardizacija eseja za određivanje koncentracije hepcidina-25 danas je jedan od glavnih razloga zašto hepcidin-25

još uvek nije našao svoje mesto u rutinskoj kliničkoj upotrebi. Radovi na razrešavanju pomenutih problema sa aspekta kreiranja lanca sledljivosti do primarnog referentnog materijala, definisanje referentne metode i komutabilnog sekundarnog referentnog materijala su u toku (302, 303). Lanac sledljivosti korišćenog testa za određivanje koncentracije hepcidina-25 do nedavno predloženog primarnog referentnog materijala (302) tek treba da se uspostavi. Ograničenje naše studije je da nedostatak rezultata deponovanog gvožđa u koštanoj srži i magnetne rezonance jetre.

Uzimajući u obzir da je procena anemije u inflamaciji prilično otežana i kompleksna, a da je nove eritrocitne parametre danas moguće odrediti različitim tehnologijama na platformama hematoloških analizatora, hepcidin-25 zajedno sa pomenutim hematološkim parametrima može biti koristan u proceni ESRD bolesnika. Da li određivanje hepcidina-25 može naći svoje mesto u rutinskoj kliničkoj praksi kao alat za identifikaciju bolesnika koji će imati benefit od budućih strategija lečenja anemije ostaje da se razjasni budućim istraživanjima.

5.10. Analiza zastupljenosti varijanti A736V u genu *TMPRSS6*, C282Y i H63D u genu *HFE* i haplotipa C282Y i H63D *HFE* u odnosu na pol i razlika u koncentraciji hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u odnosu na A736V *TMPRSS6*, C282Y i H63D *HFE* kod bolesnika u ESRD

U sprovedenom istraživanju nisu utvrđene razlike u zastupljenosti varijanti A736V u genu *TMPRSS6*, H63D i C282Y u genu *HFE* i haplotipova (H63D i C282Y) *HFE* gena između polova. Nekoliko studija je pokazalo postojanje razlike u distribuciji polimorfizama *TMPRSS6* i *HFE* između polova u određenim bolestima (276, 277), međutim nijedna studija do sada nije analizirala postojanje navedenih razlika prema polu kod bolesnika u ESRD. U našoj studiji su nađene više koncentracije hepcidina-25 i feritina kod muškaraca nego kod žena u odnosu na *HFE* haplotipove. Literaturni podaci pokazuju da su koncentracije hepcidina kod muškaraca konstantne tokom godina i da su veće u odnosu na žene koje imaju tendenciju ka višim koncentracijama hepcidina tokom napredovanja kroz menopauzu (38). Međutim, naši rezultati ukazuju na razliku u koncentraciji hepcidina-25 između polova u odnosu na haplotipove *HFE* gena. Naime, muškarci sa haplotipom C282Y / wt su imali najviše koncentracije hepcidina i feritina. Naši rezultati upućuju na zaključak da prisustvo haplotipa C282Y / wt kod muškaraca dovodi do povećane sinteze hepcidina, koji inhibira izlazak gvožđa iz makrofaga i utiče na razvoj anemije. Slično rezultatima dobijenim u našem istraživanju, Sørensen i sar. su u velikoj

studiji Danish Blood Donor Study zaključili da muškarci heterozigoti bilo koje dve *HFE* varijante ispoljavaju više koncentracije feritina od wt homozigota (efekat je bio veći za *HFE* C282Y), dok takva razlika nije primećena kod žena (304). Ovo zapažanje može biti klinički relevantno sa aspekta lečenja anemije bolesnika u krajnjem stadijumu bubrežne slabosti.

Utvrđene su značajno niže koncentracije serumskog transferina i posledično povećana saturacija transferina kod žena u ESRD koje su nosioci A alela (A/G i A/A) u odnosu na žene wild-type homozigote (G/G) u *TMPRSS6* genu. Rezultati ove teze pokazuju da je varijanta 736Val u genu *TMPRSS6* povezana sa niskom koncentracijom transferina i visokom saturacijom transferina kod anemičnih žena u krajnjem stadijumu bubrežne slabosti. Nai i sar. (90) su uočili da su homozigoti varijante 736Val u genu *TMPRSS6* (genotip A/A prema SNP nomenklaturi) povezani sa značajno višim koncentracijama hepcidina-25, nižom saturacijom transferina i nižim serumskim gvoždem u odnosu na homozigote varijante 736Ala u genu *TMPRSS6* (genotip G/G prema SNP nomenklatura) kod zdravih individua. Ova grupa autora je takođe pokazala da G alel varijante rs855791 u genu *TMPRSS6* efikasnije inhibira hepcidin od A alela. Međutim, sa druge strane Galesloot i sar. su u istraživanju na opštoj populaciji pokazali da uticaj varijanti rs855791 u genu *TMPRSS6* na feritin, serumsko gvožđe, saturaciju transferina i TIBC ne zavisi od koncentracije hepcidina. U navedenoj studiji uticaj je korigovan u odnosu na starost i pol (273). Takođe, Galesloot i sar. su pokazali da je saturacija transferina snižena, i TIBC povišen kod osoba sa varijantama A/G i A/A gena *TMPRSS6* u poređenju sa homozigotima G/G *TMPRSS6* (273), što se slaže sa rezultatima određenim kod žena u ESRD u našem istraživanju. Razlike između polova u nivoima transferina i saturaciji transferina, povezane sa varijantama rs855791 u genu *TMPRSS6* kod anemičnih bolesnika u ESRD, su potencijalno klinički relevantne, međutim patofiziološki mehanizam treba razmotriti u okviru rezultata obimnijih studija.

5.11. Dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 i markera statusa gvožđa za razlikovanje anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije

Rezultati našeg istraživanja su ukazali na odlične dijagnostičke karakteristike hepcidina-25, feritina, TSAT i MCV za razlikovanje ACD od IDA. Najbolje dijagnostičke karakteristike za hepcidin-25 su određene pri koncentraciji od 9,32 µg/L, što je u skladu sa literaturnim podacima (267, 268, 305). Valenti i sar. su istraživali odnos koncentracije hepcidina i metabolizma gvožđa, ukazujući da je adekvatan balans gvožđa verovatno prisutan

kod većine bolesnika u drugom i trećem kvartilu koncentracija hepcidina, što je odgovaralo opsegu vrednosti od 1,56 do 49,8 $\mu\text{g/L}$ (268). Optimalna granična vrednost koncentracije hepcidina-25, određena u našoj studiji, nalazi se u donjem kvartilu opsega prikazanog u studiji Valenti i sar. (268), i u skladu je sa rezultatima Wagner i sar. (269). Koncentracije feritina, određene u našem istraživanju, su uglavnom bile unutar preporučenih vrednosti za bolesnike u ESRD. Međutim, imajući u vidu širok raspon graničnih vrednosti koncentracije feritina za detektovanje deficita gvožđa i sklonost bolesnika u ESRD ka gubitku gvožđa (188, 189), isključivanje koegzistirajućeg nedostatka gvožđa, posebno u prisustvu inflamacije ili uticaja osnovne bolesti, predstavlja jedan od značajnih kliničkih izazova u nefrologiji.

U našoj studiji je utvrđena odlična specifičnost od 100% i veoma dobra osetljivost od 87% pri koncentraciji feritina od 48,2 $\mu\text{g/L}$ za razlikovanje ACD od IDA, što je očekivana vrednost i slaže se sa prethodno objavljenim podacima (188, 189, 267, 294, 306). U pogledu parametra TSAT, najbolja specifičnost i osetljivost je određena pri graničnoj vrednosti od $\geq 16,8\%$. Detaljnije analizirajući TSAT u pogledu metabolizma gvožđa, određena vrednost govori da je količina gvožđa dovoljna da zadovolji osnovne potrebe eritropoeze bolesnika u ESRD. Uprkos činjenici da se preporučena vrednost TSAT od $\geq 20\%$ uglavnom odnosi na zdravu populaciju, niži rezultat u našem istraživanju je očekivan u hroničnoj bubrežnoj slabosti. U pogledu morfoloških karakteristika eritrocita, anemija zbog primarnog nedostatka gvožđa je klasifikovana na osnovu vrednosti $\text{MCV} < 80 \text{ fL}$ kao mikrocitna, za razliku od normohromne normocitne anemije koja je standardna karakteristika bolesnika sa anemijom hronične bolesti (68, 271). Određena granična vrednost MCV od 81 fL sa odličnim dijagnostičkim karakteristikama ($\text{AUC} = 0,988$, osetljivost 90%, specifičnost 100%) za razlikovanje ACD od IDA je očekivana imajući u vidu morfološke karakteristike eritrocita koji definišu ACD i IDA, pri čemu vrednost $\text{MCV} < 81 \text{ fL}$ daje informaciju koja ide u prilog deficitu gvožđa. Pri interpretaciji dobijenih rezultata treba uzeti u obzir da je metabolizam gvožđa kompleksan i dinamičan proces sa brзом izmenom odeljaka i uprkos nađenim veoma visokim vrednostima osetljivosti i specifičnosti, pomenuti parametri mogu biti od pomoći u proceni statusa gvožđa i primeni *i.v.* gvožđa i ESAs kod bolesnika u ESRD ukoliko su zajedno ispitani.

6. Zaključak

U skladu sa postavljenim ciljevima i rezultatima moguće je izneti sledeće zaključke:

1. Koncentracija hepcidina-25 je određena u serumu bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolnoj grupi. Utvrđene su značajno više koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti u odnosu na ispitanike sa sideropenijskom anemijom i kontrolnu grupu, i značajno više koncentracije hepcidina-25 u kontrolnoj grupi u odnosu na ispitanike sa sideropenijskom anemijom.
2. Rezultati naše studije nisu pokazali da postoji značajna razlika u zastupljenosti genotipova varijanti A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE* između bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti, ispitanika sa sideropenijskom anemijom i kontrolne grupe. Retke homozigotne varijante A/A C282Y *HFE* i G/G H63D *HFE* nisu nađene kod ispitivanih grupa u našoj studiji.
3. Određene su vrednosti osnovnih i novih hematoloških parametara, markera statusa gvožđa u serumu (gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, transferin, saturacija transferina, feritin, solubilni transferinski receptori) i koncentracija hsCRP u ispitivanim grupama. U pogledu hematoloških parametara utvrđeno je da su bolesnici u ESRD i ispitanici sa sideropenijskom anemijom imali klinički manifestnu anemiju sa približno istim koncentracijama hemoglobina i hematokrita, koje su bile značajno niže od kontrolne grupe. Sideropenijska anemija imala je karakteristike mikrocitne, hipohromne anemije, sa niskom koncentracijom gvožđa u serumu, sniženom saturacijom transferina i visokim ukupnim kapacitetom vezivanja gvožđa, koncentracijom transferina, sTfR, i veoma niskom koncentracijom feritina. Anemija hronične bolesti je dijagnostikovana sa blagim do umerenim smanjenjem koncentracije hemoglobina, normocitnim normohromnim eritrocitima, nisko – normalnom koncentracijom serumskog gvožđa, sniženim TIBC, normalnom saturacijom transferina i normalnim ili povišenim koncentracijama feritina. Utvrđena je značajno viša koncentracija hsCRP kod bolesnika u ESRD u odnosu na ispitanike sa sideropenijskom anemijom i zdrave osobe, što je pokazatelj hronične inflamacije kod pacijenata u ESRD. Određene razlike u profilu statusa gvožđa, inflamacije i hematološkim parametrima u skladu su sa specifičnim razlikama između sideropenijske i anemije hronične bolesti.

4. Novi hematološki parametri %HYPO i LHD% bili su značajno viši u grupi bolesnika sa sideropenijskom anemijom u poređenju sa bolesnicima u ESRD i kontrolnom grupom, i značajno viši kod bolesnika u ESRD u odnosu na kontrolnu grupu. Sadržaj hemoglobina u retikulocitu (CHr) je u grupi bolesnika u ESRD i kontrolnoj grupi bio značajno viši u poređenju sa ispitanicima sa sideropenijskom anemijom, dok se bolesnici u ESRD i kontrolna grupa nisu značajno razlikovali.

5. Kod bolesnika u ESRD lečenih hroničnim programom hemodijalize utvrđena je značajna povezanost koncentracije hepcidina-25 sa deponovanim gvožđem i inflamacijom (određene koncentracijom feritina) i aktivnom eritropoezom (određena apsolutnim brojem retikulocita), nezavisno od primene ESAs. Koncentracija hsCRP > 5mg/L je bila statistički značajno povezana sa koncentracijom hepcidina-25 kod svih bolesnika u ESRD lečenih hemodijaliznim tretmanom, kao i u grupi na terapiji ESAs. Specifične karakteristike grupe HD bolesnika koji nisu lečeni ESAs i kod kojih su utvrđene koncentracije hepcidina-25 i feritina (reaktanti akutne faze) slične koncentracijama u kontrolnoj grupi zajedno sa niskom koncentracijom hsCRP verovatno su doprinele izostanku značajne povezanosti koncentracije hsCRP > 5mg/L sa koncentracijom hepcidina-25. Rezultati multiple linearne regresione analize su pokazali da u celoj grupi bolesnika lečenih hemodijalizom 72,6% varijanse u koncentraciji hepcidina-25 može biti objašnjeno prediktorskim varijablama feritinom, apsolutnim brojem retikulocita, i koncentracijom hsCRP > 5 mg/L, u grupi bolesnika bez terapije ESAs 74,6% i u grupi lečenih ESAs 60,6%. Feritin i hsCRP > 5 mg/L su bili pozitivni, a apsolutni broj retikulocita negativni prediktor koncentracije hepcidina-25.

6. Kod bolesnika na hroničnom tretmanu dijalizom, u toku terapije održavanja ESAs, koncentracija hepcidina-25 nije značajno korelirala sa dozom ESAs i dozom *i.v.* gvožđa. Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije hepcidina-25 sa vrstom ESAs i indeksom rezistencije na ESAs (ERI). Utvrđena je statistički značajna povezanost preporučene dnevne doze (DDD) ESAs sa apsolutnim brojem retikulocita kod bolesnika na HD tretmanu u toku terapije održavanja ESAs.
Uzimajući u obzir navedene rezultate, klinička korisnost hepcidina-25 kao markera neadekvatnog odgovora na terapiju ESAs ostaje upitna. Prospektivna

longitudinalna studija na većem broju dobro selektovanih ispitanika mogla bi pomoći u donošenju jasnijeg zaključka o odnosu između hepcidina-25 i primenjene doze ESAs.

7. U grupi anemičnih bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa utvrđen je statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na funkcionalnu raspoloživost gvožđa za sintezu hemoglobina određenu novim hematološkim parametrima CHr (RSf). Koncentracija hepcidina-25 je značajno negativno korelirala sa nedostatkom gvožđa (%HYPO) i aktivnom eritropoezom (RET i IRF) kod bolesnika u ESRD sa apsolutnim deficitom gvožđa. Rezultati teze ukazuju da granična vrednost hepcidina-25 od 66,13 $\mu\text{g/L}$ ima prihvatljive dijagnostičke karakteristike i negativnu prediktivnu vrednost u razlikovanju ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa. Uzimajući u obzir da je procena anemije u inflamaciji kompleksna, hepcidin-25, zajedno sa novim hematološkim parametrima, može biti koristan dodatni dijagnostički alat u proceni statusa gvožđa kod bolesnika u ESRD.
8. U sprovedenom istraživanju nisu nađene razlike u zastupljenosti varijanti gena *TMPRSS6* A736V, *HFE* H63D i *HFE* C282Y, kao i *HFE* haplotipova između muškaraca i žena u grupi ESRD bolesnika. Rezultati ukazuju na razliku u koncentraciji hepcidina-25 između polova u odnosu na haplotipove *HFE* gena. Utvrđene su više koncentracije hepcidina-25 i feritina kod muškaraca nego kod žena u odnosu na *HFE* haplotipove. Muškarci sa haplotipom C282Y / wt su imali najviše koncentracije hepcidina i feritina. Ovo zapažanje može biti klinički relevantno sa aspekta lečenja anemije bolesnika u krajnjem stadijumu bubrežne slabosti. Utvrđene su značajno niže koncentracije serumskog transferina i posledično povećana saturacija transferina kod žena u ESRD koje su nosioci A alela (A/G i A/A) u odnosu na žene wild-type homozigote (G/G) u genu *TMPRSS6*. Rezultati ove teze pokazuju da je varijanta 736Val u genu *TMPRSS6* povezana sa niskom koncentracijom transferina i visokom saturacijom transferina kod anemičnih žena u ESRD. Razlike između polova u nivoima transferina i saturaciji transferina, povezane sa varijantama rs855791 u genu *TMPRSS6* kod anemičnih bolesnika u ESRD su potencijalno klinički relevantne, međutim patofiziološki mehanizam treba razmotriti u okviru rezultata obimnijih studija.

9. Utvrđena je optimalna granična vrednost za hepcidin-25 pri koncentraciji od $\geq 9,32$ $\mu\text{g/L}$ (AUC = 0,932, osetljivost 90%, specifičnost 100%), feritin od $\geq 48,2$ $\mu\text{g/L}$ (AUC = 0,991, osetljivost 87%, specifičnost 100%), TSAT od $\geq 16,8\%$ (AUC = 0,958, osetljivost 91%, specifičnost 84%) i MCV od ≥ 81 fL (AUC = 0,988, osetljivost 90%, specifičnost 100%) u razlikovanju ACD od IDA.

7. Literatura

1. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*. 2008;112(2):219-30.
2. Finch CA, Harker LA, Cook JD. Kinetics of the formed elements of human blood. *Blood*. 1977;50(4):699-707.
3. Wilde, Henry. Professor Clement Alfred Finch: hematologist, humanist, and mentor for many (July 4, 1915 - June 28, 2010). *Asian Biomed*. 2010;4(6):991-91.
4. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1633-42.
5. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7806-10.
6. Ganz T. The Discovery of the Iron-Regulatory Hormone Hepcidin. *Clin chem*. 2019;65(10):1330-31.
7. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000;480(2-3):147-50.
8. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-19.
9. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8780-85.
10. Dopsaj V, Spasojević K, Marisavljević D, Terzić B, Memon L. Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemija. Drugo dopunjeno izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012.
11. Wang C-Y, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*. 2019;133(1):18-29.
12. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int*. 2017;21 Suppl 1(Suppl 1):S6-s20.
13. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. 2017;168(3):344-61.
14. Bystrom LM, Guzman ML, Rivella S. Iron and reactive oxygen species: friends or foes of cancer cells? *Antioxid redox signal*. 2014;20(12):1917-24.
15. Lane DJ, Merlot AM, Huang ML, Bae DH, Jansson PJ, Sahni S, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(5):1130-44.
16. Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients*. 2017;9(7):671.
17. Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet*. 2000;1(3):208-17.
18. de Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol*. 2014;5:9.

19. Fillet G, Beguin Y, Baldelli L. Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood*. 1989;74(2):844-51.
20. Morgan EH, Walters MN. Iron storage in human disease. Fractionation of hepatic and splenic iron into ferritin and haemosiderin with histochemical correlations. *J Clin Pathol*. 1963;16(2):101-07.
21. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6493.
22. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2001;291(5509):1755-59.
23. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-93.
24. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1426-33.
25. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10812-17.
26. Cherukuri S, Potla R, Sarkar J, Nurko S, Harris ZL, Fox PL. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab*. 2005;2(5):309-19.
27. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*. 1994;84(6):1697-702.
28. Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*. 2020;586(7831):807-11.
29. Ganz T. Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(2):171-82.
30. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*. 2007;110(6):2182-89.
31. Lakhali-Littleton S, Wolna M, Chung YJ, Christian HC, Heather LC, Brescia M, et al. An essential cell-autonomous role for hepcidin in cardiac iron homeostasis. *eLife*. 2016;5:e19804.
32. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol*. 2005;184(2):361-70.
33. Liu XB, Yang F, Haile DJ. Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(1):33-46.
34. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131(3):788-96.
35. Campostrini N, Castagna A, Zaninotto F, Bedogna V, Tessitore N, Poli A, et al. Evaluation of Hepcidin Isoforms in Hemodialysis Patients by a Proteomic Approach Based on SELDI-TOF MS. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:329646.

36. Kroot JJC, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Heparin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. *Clin Chem*. 2011;57(12):1650-69.
37. Laarakkers CM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, et al. Improved mass spectrometry assay for plasma heparin: detection and characterization of a novel heparin isoform. *PLoS One*. 2013;8(10):e75518.
38. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, et al. Serum heparin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*. 2011;117(25):e218-25.
39. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum heparin. *Blood*. 2008;112(10):4292-97.
40. Troutt JS, Rudling M, Persson L, Ståhle L, Angelin B, Butterfield AM, et al. Circulating human heparin-25 concentrations display a diurnal rhythm, increase with prolonged fasting, and are reduced by growth hormone administration. *Clin Chem*. 2012;58(8):1225-32.
41. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human heparin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37597-603.
42. Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003;102(3):783-88.
43. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of heparin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*. 2006;107(1):328-33.
44. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. 2008;93(1):90-97.
45. Nemeth E, Ganz T. The role of heparin in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009;122(2-3):78-86.
46. Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G199-203.
47. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2000;5(2):299-309.
48. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;403(6771):776-81.
49. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000;275(26):19906-12.
50. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005;1(3):191-200.
51. Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Heparin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*. 2011;118(10):2868-77.
52. Zhang Z, Zhang F, Guo X, An P, Tao Y, Wang F. Ferroportin1 in hepatocytes and macrophages is required for the efficient mobilization of body iron stores in mice. *Hepatology*. 2012;56(3):961-71.

53. Lakhali-Littleton S, Wolna M, Carr CA, Miller JJ, Christian HC, Ball V, et al. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(10):3164-69.
54. Zhang DL, Wu J. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science*. 2018;359(6383):1520-23.
55. Taniguchi R, Kato HE, Font J, Deshpande CN, Wada M, Ito K, et al. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat Commun*. 2015;6:8545.
56. Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, et al. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*. 2018;131(8):899-910.
57. Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez MJ, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab*. 2012;15(6):918-24.
58. Pietrangelo A. Non-HFE hemochromatosis. *Hepatology*. 2004;39(1):21-29.
59. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang HJ, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(1):G156-63.
60. Mitchell CJ, Shawki A, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;306(5):C450-59.
61. Deshpande CN, Ruwe TA, Shawki A, Xin V, Vieth KR, Valore EV, et al. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun*. 2018;9(1):3075-75.
62. Philpott CC, Patel SJ, Protchenko O. Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(11):118830.
63. Yanatori I, Richardson DR, Imada K, Kishi F. Iron Export through the Transporter Ferroportin 1 Is Modulated by the Iron Chaperone PCBP2. *J Biol Chem*. 2016;291(33):17303-18.
64. Link C, Knopf JD, Marques O, Lemberg MK, Muckenthaler MU. The role of cellular iron deficiency in controlling iron export. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021;1865(3):129829.
65. Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen OE, Ganz T. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood*. 2005;105(4):1797-802.
66. Jiang L, Wang J, Wang K, Wang H, Wu Q, Yang C, et al. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation. *Blood*. 2021;138(8):689-705.
67. Manolova V, Nyffenegger N, Flace A, Altermatt P, Varol A, Doucerain C, et al. Oral ferroportin inhibitor ameliorates ineffective erythropoiesis in a model of β -thalassemia. *J Clin Invest*. 2019;130(1):491-506.
68. Ganz T. Anemia of Inflammation. *N Engl J Med*. 2019;381(12):1148-57.

69. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101(7):2461-63.
70. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*. 2011;53(4):1333-41.
71. Ganz T. Heparin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;306:183-98.
72. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1271-76.
73. Lanser L, Fuchs D, Kurz K, Weiss G. Physiology and Inflammation Driven Pathophysiology of Iron Homeostasis—Mechanistic Insights into Anemia of Inflammation and Its Treatment. *Nutrients*. 2021;13(11):3732.
74. Clara C, Antonella N, Laura S. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. 2020;105(2):260-72.
75. Zhao N, Nizzi CP, Anderson SA, Wang J, Ueno A, Tsukamoto H, et al. Low intracellular iron increases the stability of matriptase-2. *J Biol Chem*. 2015;290(7):4432-46.
76. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008;8(6):502-11.
77. Schmidt PJ, Fleming MD. Transgenic HFE-dependent induction of hepcidin in mice does not require transferrin receptor-2. *Am J Hematol*. 2012;87(6):588-95.
78. Colucci S, Pagani A, Pettinato M, Artuso I, Nai A, Camaschella C, et al. The immunophilin FKBP12 inhibits hepcidin expression by binding the BMP type I receptor ALK2 in hepatocytes. *Blood*. 2017;130(19):2111-20.
79. Pasricha SR, Lim PJ, Duarte TL, Casu C, Oosterhuis D, Mieczko-Sanecka K, et al. Heparin is regulated by promoter-associated histone acetylation and HDAC3. *Nat Commun*. 2017;8(1):403.
80. Wang C-Y, Xu Y, Traeger L, Dogan DY, Xiao X, Steinbicker AU, et al. Erythroferrone lowers hepcidin by sequestering BMP2/6 heterodimer from binding to the BMP type I receptor ALK3. *Blood*. 2020;135(6):453-56.
81. Pietrangelo A. Genetics, Genetic Testing, and Management of Hemochromatosis: 15 Years Since Heparin. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1240-51.e4.
82. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36(1):77-82.
83. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33(1):21-22.
84. Adams PC. Chapter 64 - Hemochromatosis. In: Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology (Sixth Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders; 2012. p. 1127-44.

85. Katsarou MS, Papasavva M, Latsi R, Drakoulis N. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. *Vitam Horm.* 2019;110:201-22.
86. Kato J, Fujikawa K, Kanda M, Fukuda N, Sasaki K, Takayama T, et al. A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):191-97.
87. Barton JC, Edwards CQ, Acton RT. HFE gene: Structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene.* 2015;574(2):179-92.
88. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis — A New Look at an Old Disease. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2383-97.
89. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, McLaren CE, et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology.* 2009;50(1):94-101.
90. Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood.* 2011;118(16):4459-62.
91. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet.* 2008;40(5):569-71.
92. De Falco L, Sanchez M, Silvestri L, Kannengiesser C, Muckenthaler MU, Iolascon A, et al. Iron refractory iron deficiency anemia. *Haematologica.* 2013;98(6):845-53.
93. Benyamin B, Ferreira MA, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RP, McEvoy BP, et al. Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nat Genet.* 2009;41(11):1173-75.
94. Chambers JC, Zhang W, Li Y, Sehmi J, Wass MN, Zabaneh D, et al. Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. *Nat Genet.* 2009;41(11):1170-72.
95. SNPedia rs855791. Dostupno na <https://www.snpedia.com/index.php/rs855791> (pristupljeno 25.02.2022.).
96. Wang CY, Babitt JL. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(3):189-97.
97. Casu C, Nemeth E. Hepcidin agonists as therapeutic tools. *Blood.* 2018;131(16):1790-4.
98. Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* 2009;41(4):482-87.
99. Canali S, Wang CY, Zumbrennen-Bullough KB, Bayer A, Babitt JL. Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *Am J Hematol.* 2017;92(11):1204-13.
100. Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood.* 2011;118(15):4224-30.
101. Mayeur C, Leyton PA, Kolodziej SA, Yu B, Bloch KD. BMP type II receptors have redundant roles in the regulation of hepatic hepcidin gene expression and iron metabolism. *Blood.* 2014;124(13):2116-23.

102. Wang CY, Core AB, Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Ozer S, Umans L, et al. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood*. 2017;130(1):73-83.
103. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2(6):399-409.
104. Vujić Spasić M, Sparla R, Mleczko-Sanecka K, Migas MC, Breitkopf-Heinlein K, Dooley S, et al. Smad6 and Smad7 are co-regulated with hepcidin in mouse models of iron overload. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(1):76-84.
105. Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Core AB, Wang CY, Nairz M, Bouley R, et al. Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood*. 2017;129(4):405-14.
106. Koch PS, Olsavszky V. Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood*. 2017;129(4):415-19.
107. Isaacs MJ, Kawakami Y, Allendorph GP, Yoon BH, Izpisua Belmonte JC, Choe S. Bone morphogenetic protein-2 and -6 heterodimer illustrates the nature of ligand-receptor assembly. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1469-77.
108. Milet J, Dehais V, Bourgain C, Jouanolle AM, Mosser A, Perrin M, et al. Common variants in the BMP2, BMP4, and HJV genes of the hepcidin regulation pathway modulate HFE hemochromatosis penetrance. *Am J Hum Genet*. 2007;81(4):799-807.
109. Daher R, Kannengiesser C, Houamel D, Lefebvre T, Bardou-Jacquet E, Ducrot N, et al. Heterozygous Mutations in BMP6 Pro-peptide Lead to Inappropriate Hepcidin Synthesis and Moderate Iron Overload in Humans. *Gastroenterology*. 2016;150(3):672-83.e4.
110. Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, et al. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29820-27.
111. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006;38(5):531-39.
112. Healey EG, Bishop B, Elegheert J, Bell CH, Padilla-Parra S, Siebold C. Repulsive guidance molecule is a structural bridge between neogenin and bone morphogenetic protein. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(6):458-65.
113. Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(5):471-80.
114. D'Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *J Hepatol*. 2012;57(5):1052-60.
115. Zhao N, Maxson JE, Zhang RH, Wahedi M, Enns CA, Zhang AS. Neogenin Facilitates the Induction of Hepcidin Expression by Hemojuvelin in the Liver. *J Biol Chem*. 2016;291(23):12322-35.

116. Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*. 2010;115(15):3136-45.
117. Wu X-g, Wang Y, Wu Q, Cheng W-H, Liu W, Zhao Y, et al. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*. 2014;124(8):1335-43.
118. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 1999;274(30):20826-32.
119. Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN. Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology*. 2009;50(6):1992-2000.
120. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*. 2009;9(3):217-27.
121. Pietrangelo A, Caleffi A, Henrion J, Ferrara F, Corradini E, Kulaksiz H, et al. Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. *Gastroenterology*. 2005;128(2):470-79.
122. Latour C, Besson-Fournier C, Meynard D, Silvestri L, Gourbeyre O, Aguilar-Martinez P, et al. Differing impact of the deletion of hemochromatosis-associated molecules HFE and transferrin receptor-2 on the iron phenotype of mice lacking bone morphogenetic protein 6 or hemojuvelin. *Hepatology*. 2016;63(1):126-37.
123. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L, et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood*. 2015;125(7):1170-9.
124. Wahedi M, Wortham AM, Kleven MD, Zhao N, Jue S, Enns CA, et al. Matriptase-2 suppresses hepcidin expression by cleaving multiple components of the hepcidin induction pathway. *J Biol Chem*. 2017;292(44):18354-71.
125. Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, et al. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*. 2011;54(1):273-84.
126. Lim PJ, Duarte TL, Arezes J, et al. Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat Metab*. 2019;1(5):519-31.
127. Jenkitkasemwong S, Wang CY, Coffey R, Zhang W, Chan A, Biel T, et al. SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metab*. 2015;22(1):138-50.
128. Johnson MB, Enns CA. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood*. 2004;104(13):4287-93.
129. Johnson MB, Chen J, Murchison N, Green FA, Enns CA. Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Mol Biol Cell*. 2007;18(3):743-54.
130. Pagani A, Vieillevoys M, Nai A, Rausa M, Ladli M, Lacombe C, et al. Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. *Haematologica*. 2015;100(4):458-65.

131. Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40(1):122-31.
132. Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, Jain C, Jurkovic MT, Wu J, et al. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest.* 2019;129(1):336-48.
133. Weiss G, Ganz T. Anemia of inflammation. *Blood.* 2019;133(1):40-50.
134. Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes Dis.* 2019;6(4):328-32.
135. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006;108(9):3204-49.
136. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M-P, et al. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood.* 2012;120(2):431-39.
137. Broeker KAE, Fuchs MAA, Schrankl J, Kurt B, Nolan KA, Wenger RH, et al. Different subpopulations of kidney interstitial cells produce erythropoietin and factors supporting tissue oxygenation in response to hypoxia in vivo. *Kidney Int.* 2020;98(4):918-31.
138. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 2014;46(7):678-84.
139. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut.* 2014;63(12):1951-59.
140. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007;13(9):1096-101.
141. Mirciov CSG, Wilkins SJ, Hung GCC, Helman SL, Anderson GJ, Frazer DM. Circulating iron levels influence the regulation of hepcidin following stimulated erythropoiesis. *Haematologica.* 2018;103(10):1616-26.
142. Nai A, Rubio A, Campanella A, Gourbeyre O, Artuso I, Bordini J, et al. Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood.* 2016;127(19):2327-36.
143. Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol.* 2014;5:104.
144. Canali S, Vecchi C, Garuti C, Montosi G, Babitt JL, Pietrangelo A. The SMAD Pathway Is Required for Hepcidin Response During Endoplasmic Reticulum Stress. *Endocrinology.* 2016;157(10):3935-45.
145. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol cell.* 2008;30(4):393-402.
146. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 2011;365(6):537-47.
147. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(7):1721-32.

148. Sanghani NS, Haase VH. Hypoxia-Inducible Factor Activators in Renal Anemia: Current Clinical Experience. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2019;26(4):253-66.
149. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510-14.
150. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117(4):1068-77.
151. Pan S-Y, Chiang W-C, Chen Y-M. The journey from erythropoietin to 2019 Nobel Prize: Focus on hypoxia-inducible factors in the kidney. *J Formos Med Assoc.* 2021;120(1, Part 1):60-67.
152. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-68.
153. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468-72.
154. Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff A-K, et al. Evidence for a Lack of a Direct Transcriptional Suppression of the Iron Regulatory Peptide Hepcidin by Hypoxia-Inducible Factors. *PLoS One.* 2009;4(11):e7875.
155. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood.* 2014;124(4):479-82.
156. Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.* 2009;9(2):152-64.
157. Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology.* 2011;140(7):2044-55.
158. Anderson SA, Nizzi CP, Chang YI, Deck KM, Schmidt PJ, Galy B, et al. The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab.* 2013;17(2):282-90.
159. HIF Nobel Prize Physiology Medicine 2019 Hegasy ENG.png. Dostupno na [https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:HIF Nobel Prize Physiology Medicine 2019 Hegasy ENG.png&oldid=491276426](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:HIF_Nobel_Prize_Physiology_Medicine_2019_Hegasy_ENG.png&oldid=491276426) (pristupljeno 28.02.2022.).
160. Xiao JJ, Krzyzanski W, Wang Y-M, Li H, Rose MJ, Ma M, et al. Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab 12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. *AAPS J.* 2010;12(4):646-57.
161. Fung E, Nemeth E. Manipulation of the hepcidin pathway for therapeutic purposes. *Haematologica.* 2013;98(11):1667-76.
162. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to α -2-macroglobulin in blood. *Blood.* 2009;113(24):6225-36.

163. Diepeveen LE, Laarakkers CM, Peters HPE, van Herwaarden AE, Groenewoud H. Unraveling Hepcidin Plasma Protein Binding: Evidence from Peritoneal Equilibration Testing. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(3).
164. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EHJM, et al. Advances in Quantitative Hepcidin Measurements by Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One*. 2008;3(7):e2706.
165. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*. 2005;106(5):1864-66.
166. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158765.
167. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020;395(10225):709-33.
168. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet*. 2015;385(9981):1975-82.
169. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse: Hronična bolest bubrega. *Klinički vodič 9/12; Beograd 2013*.
170. Carney EF. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(5):251-51.
171. KDOQI; National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease [published correction appears in *Am J Kidney Dis*. 2006 Sep;48(3):518]. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(5 Suppl 3):S11-S145.
172. McMurray JJV, Parfrey PS, Adamson JW, Aljama P, Berns JS, Bohlius J et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) anemia work group. KDIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2012;2:279–335.
173. Mikhail A, Brown C, Williams JA, Mathrani V, Shrivastava R, Evans J, et al. Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):345.
174. Stauffer ME, Fan T. Prevalence of Anemia in Chronic Kidney Disease in the United States. *PLoS One*. 2014;9(1):e84943.
175. Djukanović L, Aksić-Miličević B, Antić M, Baković J, Varga Ž, Gojaković B, et al. Epidemiology of end-stage renal disease and hemodialysis treatment in Serbia at the turn of the millennium. *Hemodial Int*. 2012;16(4):517-25.
176. Camaschella C. Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*. 2015;372(19):1832-43.
177. Nemeth E, Ganz T. Anemia of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(4):671-81, vi.
178. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.

179. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(10):1631-34.
180. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet.* 2016;387(10021):907-16.
181. Gaweda AE. Markers of iron status in chronic kidney disease. *Hemodial Int.* 2017;21 Suppl 1:S21-S7.
182. Elliott J, Mishler D, Agarwal R. Hyporesponsiveness to erythropoietin: causes and management. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2009;16(2):94-100.
183. Besarab A. Anemia of renal disease in diseases of kidney and urinary tract. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*, 7th edn Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Company. 2001:2719-34.
184. Babitt JL, Eisenga MF, Haase VH, Kshirsagar AV, Levin A, Locatelli F, et al. Controversies in optimal anemia management: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. *Kidney Int.* 2021;99(6):1280-95.
185. Macdougall IC, Bircher AJ, Eckardt KU, Obrador GT, Pollock CA, Stenvinkel P, et al. Iron management in chronic kidney disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2016;89(1):28-39.
186. Hocken AG, Marwah PK. Iatrogenic contribution to anaemia of chronic renal failure. *Lancet.* 1971;1(7691):164-65.
187. Wish JB, Aronoff GR, Bacon BR, Brugnara C, Eckardt KU, Ganz T, et al. Positive Iron Balance in Chronic Kidney Disease: How Much is Too Much and How to Tell? *Am J Nephrol.* 2018;47(2):72-83.
188. Kalantar-Zadeh K, Streja E, Miller JE, Nissenson AR. Intravenous iron versus erythropoiesis-stimulating agents: friends or foes in treating chronic kidney disease anemia? *Adv Chronic Kidney Dis.* 2009;16(2):143-51.
189. Wish JB. What are the Considerations in Balancing Benefits and Risks in Iron Treatment?: The Benefits of Intravenous Iron. *Semin Dial.* 2017;30(1):20-22.
190. Imai R, Higuchi T, Morimoto M, Koyamada R, Okada S. Iron Deficiency Anemia Due to the Long-term Use of a Proton Pump Inhibitor. *Intern Med.* 2018;57(6):899-901.
191. Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(1):57-61.
192. Lankhorst CE, Wish JB. Anemia in renal disease: diagnosis and management. *Blood Rev.* 2010;24(1):39-47.
193. Malyszko J, Mysliwiec M. Hepcidin in anemia and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30(1):15-30.
194. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem.* 2002;48(7):1066-76.
195. Fishbane S. Balance of Benefit and Risk in Intravenous Iron Treatment in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol.* 2016;36(2):119-23.
196. Pollak VE, Lorch JA, Shukla R, Satwah S. The importance of iron in long-term survival of maintenance hemodialysis patients treated with epoetin-alfa and intravenous iron: analysis of 9.5 years of prospectively collected data. *BMC Nephrol.* 2009;10:6.

197. Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(2):187-93.
198. Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol.* 2005;11(1):14-23.
199. Thorpe SJ, Heath A, Sharp G, Cook J, Ellis R, Worwood M. A WHO reference reagent for the Serum Transferrin Receptor (sTfR): international collaborative study to evaluate a recombinant soluble transferrin receptor preparation. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(6):815-20.
200. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol.* 2016;38 Suppl 1:123-32.
201. Dopsaj V, Mikovic-Golubovic G, Martinovic J, Kalimanovska-Ostic D. Evaluation of derived Coulter red blood cell parameters for the assessment of iron deficiency in adults with congenital heart disease. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(5):461-72.
202. Dopsaj V, Martinovic J, Dopsaj M. Early detection of iron deficiency in elite athletes: could microcytic anemia factor (Maf) be useful? *Int J Lab Hematol.* 2014;36(1):37-44.
203. Brugnara C, Laufer M, Friedman A, Bridges K, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content (CHR): early indicator of iron deficiency and response to therapy [letter]. *Blood.* 1994;83(10):3100-01.
204. Macdougall IC. What is the most appropriate strategy to monitor functional iron deficiency in the dialysed patient on rhEPO therapy? Merits of percentage hypochromic red cells as a marker of functional iron deficiency. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(4):847-49.
205. Ogawa C, Tsuchiya K, Nitta K, Maeda K. Significance of Content of the Reticulocyte Hemoglobin in the Management of Renal Anemia. *Blood Purif.* 2019;47 Suppl 2:70-73.
206. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med.* 2015;35(1):133-63.
207. Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thome M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(11):1193-202.
208. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(2):144-49.
209. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman-Coulter parameter red blood cell size factor in the study of erithropoiesis. *Int J Lab Hematol.* 2009;31(6):623-29.
210. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Biomarkers of Hypochromia: The Contemporary Assessment of Iron Status and Erythropoiesis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:603786.
211. Ogawa C, Tsuchiya K, Maeda K. Reticulocyte hemoglobin content. *Clin Chim Acta.* 2020;504:138-45.
212. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, Flax S, Dietzen DJ. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood.* 2002;99(4):1489-91.
213. Thomas C, Kirschbaum A, Boehm D, Thomas L. The diagnostic plot. *Med Oncol.* 2006;23(1):23-36.

214. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin dial.* 2002;15(5):329-37.
215. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(suppl_3):iii35-iii40.
216. Khalil S, Delehanty L, Grado S, Holy M, White Z, 3rd, Freeman K, et al. Iron modulation of erythropoiesis is associated with Scribble-mediated control of the erythropoietin receptor. *J Exp Med.* 2018;215(2):661-79.
217. Orsini M, Chateauvieux S, Rhim J, Gaigneaux A, Cheillan D, Christov C, et al. Sphingolipid-mediated inflammatory signaling leading to autophagy inhibition converts erythropoiesis to myelopoiesis in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Death Differ.* 2019;26(9):1796-812.
218. Libregts SF, Gutiérrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, et al. Chronic IFN- γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood.* 2011;118(9):2578-88.
219. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 11:39-43.
220. Kimachi M, Fukuma S, Yamazaki S, Yamamoto Y, Akizawa T, Akiba T, et al. Minor Elevation in C-Reactive Protein Levels Predicts Incidence of Erythropoiesis-Stimulating Agent Hyporesponsiveness among Hemodialysis Patients. *Nephron.* 2015;131(2):123-30.
221. Canavesi E, Alfieri C, Pelusi S, Valenti L. Hpcidin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease. *World J Nephrol.* 2012;1(6):166-76.
222. Pelusi S, Girelli D, Rametta R, Campostrini N, Alfieri C, Traglia M, et al. The A736V TMPRSS6 polymorphism influences hepcidin and iron metabolism in chronic hemodialysis patients: TMPRSS6 and hepcidin in hemodialysis. *BMC Nephrol.* 2013;14:48.
223. Valenti L, Girelli D, Valenti GF, Castagna A, Como G, Campostrini N, et al. HFE mutations modulate the effect of iron on serum hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(8):1331-37.
224. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med.* 1987;316(2):73-78.
225. Szczech LA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan DN, Sapp S, Califf RM, et al. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes. *Kidney Int.* 2008;74(6):791-98.
226. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med.* 1998;339(9):584-90.
227. Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, et al. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med.* 2006;355(20):2071-84.

228. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2006;355(20):2085-98.
229. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2019-32.
230. Drüeke TB. Lessons from clinical trials with erythropoiesis-stimulating agents (ESAs). *Ren Replace Ther.* 2018;4(1):46.
231. López-Gómez JM, Portolés JM, Aljama P. Factors that condition the response to erythropoietin in patients on hemodialysis and their relation to mortality. *Kidney Int Suppl.* 2008(111):S75-81.
232. Fishbane S, Spinowitz B. Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018;71(3):423-35.
233. Coyne DW, Kapoian T, Suki W, Singh AK, Moran JE, Dahl NV, et al. Ferric gluconate is highly efficacious in anemic hemodialysis patients with high serum ferritin and low transferrin saturation: results of the Dialysis Patients' Response to IV Iron with Elevated Ferritin (DRIVE) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):975-84.
234. Chinnadurai R, Macdougall IC, Kalra PA. Treatment of anaemia in end-stage renal disease: A double-edged iron sword? *EBioMedicine.* 2019;40:31-32.
235. Li X, Cole SR, Kshirsagar AV, Fine JP, Stürmer T, Brookhart MA. Safety of Dynamic Intravenous Iron Administration Strategies in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2019;14(5):728-37.
236. Nakanishi T, Kuragano T. Potential hazards of recent trends in liberal iron use for renal anemia. *Clin Kidney J.* 2020;14(1):59-69.
237. Nakanishi T, Kimura T, Kuragano T. The Hepcidin-Anemia Axis: Pathogenesis of Anemia in Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol.* 2019;198:124-34.
238. Macdougall IC, White C, Anker SD, Bhandari S, Farrington K, Kalra PA, et al. Intravenous Iron in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *N Engl J Med.* 2018;380(5):447-58.
239. Bailie GR, Larkina M, Goodkin DA, Li Y, Pisoni RL, Bieber B, et al. Data from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study validate an association between high intravenous iron doses and mortality. *Kidney Int.* 2015;87(1):162-68.
240. Karaboyas A, Morgenstern H, Pisoni RL, Zee J, Vanholder R, Jacobson SH, et al. Association between serum ferritin and mortality: findings from the USA, Japan and European Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(12):2234-44.
241. Weiss G, Theurl I, Eder S, Koppelstaetter C, Kurz K, Sonnweber T, et al. Serum hepcidin concentration in chronic haemodialysis patients: associations and effects of dialysis, iron and erythropoietin therapy. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(10):883-90.
242. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 2009;75(9):976-81.

243. Kato A, Tsuji T, Luo J, Sakao Y, Yasuda H, Hishida A. Association of Prohepcidin and Heparin-25 with Erythropoietin Response and Ferritin in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol*. 2008;28(1):115-21.
244. Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(3):848-53.
245. van der Weerd NC, Grooteman MP, Bots ML, van den Dorpel MA, den Hoedt CH, Mazairac AH, et al. Heparin-25 in chronic hemodialysis patients is related to residual kidney function and not to treatment with erythropoiesis stimulating agents. *PLoS One*. 2012;7(7):e39783.
246. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Heparin--a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(6):1051-56.
247. Touzot M, Lefebvre T, Roux A, Maheas C, Ridet C, Puy H, et al. Functional erythropoietin-hepcidin axis in recombinant human erythropoietin independent haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 2018;24:751-57.
248. van der Putten K, Jie KE, van den Broek D, Kraaijenhagen RJ, Laarakkers C, Swinkels DW, et al. Heparin-25 is a marker of the response rather than resistance to exogenous erythropoietin in chronic kidney disease/chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(9):943-50.
249. El Sewefy DA, Farweez BA. El Sewefy DA, Farweez BA, Behairy MA, Yassin NR. Impact of serum hepcidin and inflammatory markers on resistance to erythropoiesis-stimulating therapy in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2019;51(2):325-34.
250. Kuragano T, Shimonaka Y, Kida A, Furuta M, Nanami M, Otaki Y, et al. Determinants of Heparin in Patients on Maintenance Hemodialysis: Role of Inflammation. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):534-40.
251. World Health Organization (2015). The global prevalence of anaemia in 2011.
252. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: an analysis of error. *J Am Soc Nephrol*. 1993;4(5):1205-13.
253. WHO drug classification. ATC/DDD Index 2022. Dostupno na http://www.whocc.no/atc_ddd_index/ (pristupljeno 28.02.2022.).
254. Schneider A, Schneider MP, Scharnagl H, Jardine AG, Wanner C, Drechsler C. Predicting erythropoietin resistance in hemodialysis patients with type 2 diabetes. *BMC Nephrol*. 2013;14:67-67.
255. Levey AS, Bosch JP, Lewis J, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. *Ann Intern Med*. 1999;130(6):461-70.
256. Gauderman W and Morrison J., "Quanto 1.2: a computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies," 2007, <http://hydra.Usc.Edu/gxe>.
257. Eliades N-G, Eliades D. HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors, Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.2009.
258. Cartwright GE. The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol*. 1966;3(4):351-75.

259. Kassebaum NJ. The Global Burden of Anemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016;30(2):247-308.
260. Steinbicker AU, Muckenthaler MU. Out of balance--systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients.* 2013;5(8):3034-61.
261. Eriksson D, Goldsmith D, Teitsson S, Jackson J, van Nooten F. Cross-sectional survey in CKD patients across Europe describing the association between quality of life and anaemia. *BMC Nephrol.* 2016;17(1):97.
262. Astor BC, Coresh J, Heiss G, Pettitt D, Sarnak MJ. Kidney function and anemia as risk factors for coronary heart disease and mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J.* 2006;151(2):492-500.
263. Eisenga MF, Nolte IM, van der Meer P, Bakker SJL, Gaillard CAJM. Association of different iron deficiency cutoffs with adverse outcomes in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):225-25.
264. Hörl WH. Anaemia management and mortality risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:291.
265. Zaritsky J, Young B, Gales B, Wang HJ, Rastogi A, Westerman M, et al. Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(6):1010-14.
266. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood.* 2006;108(4):1381-87.
267. Ueda N, Takasawa K. Role of Hepcidin-25 in Chronic Kidney Disease: Anemia and Beyond. *Curr Med Chem.* 2017;24(14):1417-52.
268. Valenti L, Messa P, Pelusi S, Campostrini N, Girelli D. Hepcidin levels in chronic hemodialysis patients: a critical evaluation. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(5):613-19.
269. Wagner M, Ashby DR, Kurtz C, Alam A, Busbridge M, Raff U, et al. Hepcidin-25 in diabetic chronic kidney disease is predictive for mortality and progression to end stage renal disease. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123072-e.
270. Thomas C, Kobold U, Thomas L. Serum hepcidin-25 in comparison to biochemical markers and hematological indices for the differentiation of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(2):207-13.
271. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev.* 2017;31(4):225-33
272. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol.* 2001;154(3):193-206.
273. Galesloot TE, Geurts-Moespot AJ, den Heijer M, Sweep FC, Fleming RE, Kiemeny LA, et al. Associations of common variants in HFE and Tmprss6 with iron parameters are independent of serum hepcidin in a general population: a replication study. *J Med Genet.* 2013;50(9):593-98.
274. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010;53(1):3-22.
275. Sarić M, Zamurović L, Keckarević-Marković M, Keckarević D, Stevanović M, Savić-Pavićević D, et al. Frequency of the hemochromatosis gene mutations in the population of Serbia and Montenegro. *Clin Genet.* 2006;70(2):170-72.

276. He M, Workalemahu T, Manson JE, Hu FB, Qi L. Genetic determinants for body iron store and type 2 diabetes risk in US men and women. *PLoS One*. 2012;7(7):e40919.
277. Hollerer I, Bachmann A, Muckenthaler MU. Pathophysiological consequences and benefits of HFE mutations: 20 years of research. *Haematologica*. 2017;102(5):809-17.
278. McLaren CE, McLachlan S, Garner CP, Vulpe CD, Gordeuk VR, Eckfeldt JH, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in iron-related genes and iron status in multiethnic populations. *PLoS One*. 2012;7(6):e38339.
279. Urrechaga E, Unceta M, Borque L, Escanero JF. Low hemoglobin density potential marker of iron availability. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(1):47-51.
280. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and Reticulocyte Indices on the LH 750 as Potential Markers of Functional Iron Deficiency. *Anemia*. 2010;2010:625919.
281. Davis BH, Ornvold K, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry*. 1995;22(1):35-39.
282. Schoorl M, Schoorl M, Nubé MJ, Bartels PC. Erythropoiesis activity, iron availability and reticulocyte hemoglobinization during treatment with hemodialysis and in subjects with uremia. *Clin Lab*. 2006;52(11-12):621-29.
283. Urrechaga E. Microcytic Anemia factor (MAf) in the study of iron metabolism. 2010; 10.13140/RG.2.2.28543.00167.
284. Besarab A, Amin N, Ahsan M, Vogel SE, Zazuwa G, Frinak S, et al. Optimization of epoetin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(3):530-38.
285. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, et al. Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann Intern Med*. 1989;111(12):992-1000.
286. Okazaki M, Komatsu M, Kawaguchi H, Tsuchiya K, Nitta K. Erythropoietin resistance index and the all-cause mortality of chronic hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2014;37(2):106-12.
287. Yılmaz I, Ozkok A, Kostek O, Kolukısa A, Duran I, Odabaş AR, et al. C-reactive protein but not hepcidin, NGAL and transferrin determines the ESA resistance in hemodialysis patients. *Ren Fail*. 2016;38(1):89-95.
288. Takasawa K, Tomosugi N, Takaeda C, Maeda T, Ueda N. Regulation of Hepcidin-25 by Short- and Long-Acting rhEPO May Be Dependent on Ferritin and Predict the Response to rhEPO in Hemodialysis Patients. *Nephron Extra*. 2014;4(1):55-63.
289. Chait Y, Kalim S, Horowitz J, Hollot CV, Ankers ED, Germain MJ, et al. The greatly misunderstood erythropoietin resistance index and the case for a new responsiveness measure. *Hemodial Int*. 2016;20(3):392-98.
290. Shoji S, Inaba M, Tomosugi N, Okuno S, Ichii M, Yamakawa T, et al. Greater potency of darbepoetin- α than erythropoietin in suppression of serum hepcidin-25 and utilization of iron for erythropoiesis in hemodialysis patients. *Eur J Haematol*. 2013;90(3):237-44.
291. Suchdev PS, Williams AM, Mei Z, Flores-Ayala R, Pasricha SR, Rogers LM, et al. Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(Suppl 6):1626S-33S.

292. Tessitore N, Girelli D, Campostrini N, Bedogna V, Pietro Solero G, Castagna A, et al. Heparin is not useful as a biomarker for iron needs in haemodialysis patients on maintenance erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(12):3996-4002.
293. Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Serum Prohepcidin and Heparin in Hemodialyzed Patients Undergoing Iron Therapy. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(4):235-38.
294. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev*. 2009;23(3):95-104.
295. Akizawa T, Yamaguchi Y, Otsuka T, Reusch M. A Phase 3, Multicenter, Randomized, Two-Arm, Open-Label Study of Intermittent Oral Dosing of Roxadustat for the Treatment of Anemia in Japanese Erythropoiesis-Stimulating Agent-Naïve Chronic Kidney Disease Patients Not on Dialysis. *Nephron*. 2020;144(8):372-82.
296. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(4):726-41.
297. Eguchi A, Mochizuki T, Tsukada M, Kataoka K, Hamaguchi Y, Oguni S, et al. Serum hepcidin levels and reticulocyte hemoglobin concentrations as indicators of the iron status of peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol*. 2012;2012:239476.
298. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Magna T, Machado G, Drahi G, et al. Reassessment of Iron Biomarkers for Prediction of Dialysis Iron Overload: An MRI Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132006.
299. Stefanova D, Raychev A, Arezes J, Ruchala P, Gabayan V, Skurnik M, et al. Endogenous hepcidin and its agonist mediate resistance to selected infections by clearing non-transferrin-bound iron. *Blood*. 2017;130(3):245-57.
300. Litton E, Lim J. Iron Metabolism: An Emerging Therapeutic Target in Critical Illness. *Crit Care*. 2019;23(1):81.
301. Frost JN, Tan TK, Abbas M, Wideman SK, Bonadonna M, Stoffel NU, et al. Heparin-Mediated Hypoferremia Disrupts Immune Responses to Vaccination and Infection. *Med (N Y)*. 2021;2(2):164-79.e12.
302. Diepeveen LE, Laarakkers CMM, Martos G, Pawlak ME, Uğuz FF, Verberne K, et al. Provisional standardization of hepcidin assays: creating a traceability chain with a primary reference material, candidate reference method and a commutable secondary reference material. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(6):864-72.
303. Aune ET, Diepeveen LE, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bansal S, et al. Optimizing hepcidin measurement with a proficiency test framework and standardization improvement. *Clin Chem Lab Med*. 2021;59(2):315-23.
304. Sørensen E, Rigas AS, Thørner LW, Burgdorf KS, Pedersen OB, Petersen MS, et al. Genetic factors influencing ferritin levels in 14,126 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion*. 2016;56(3):622-27.
305. Chikwanda E, Daka V, Simakando M, Kowa S, Kaile T. Evaluation of hepcidin as a biomarker for the differential diagnosis of iron deficiency anaemia and anaemia of chronic disease. *Asian J Med Sci*. 2018;9(1):15-20.

306. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, et al. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol.* 2001;114(2):474-84.

8. Biografija

Miljan Savković je rođen 05.12.1986. godine u Aleksandrovcu. Osnovnu školu završio je u Aleksandrovcu, dok je srednju Medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, završio u Kruševcu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar upisao je 2005. godine, a završio 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,25 i ocenom 10 za završni rad. Po završetku fakulteta, obavio je pripravnički staž u Službi za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, Centar za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i položio stručni ispit za diplomirane farmaceute – medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije 2012. godine.

Doktorske akademske studije, modul Medicinska biohemija upisao je školske 2012/2013. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Školske 2015/2016. upisao je specijalističke studije za potrebe zdravstva, studijski program medicinska biohemija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, od oktobra 2013. do oktobra 2019. godine je bio angažovan kao saradnik u praktičnoj nastavi. Od početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Miljan Savković je učestvovao u izvođenju praktične nastave iz predmeta: Laboratorijska hematologija, Laboratorijska hemostaza i Klinička hemija sa molekularnom dijagnostikom 2 na integrisanim akademskim studijama – studijski program Farmacija – medicinska biohemija. Na studentskim anketama o vrednovanju pedagoškog rada saradnika ocenjen je prosečnom ocenom 4,63. Aktivno učestvuje u radu inostranih i domaćih udruženja iz oblasti Kliničke hemije i laboratorijske medicine. U okviru International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) bio je angažovan u dva mandata kao Young Scientist Member u Task Force for Young Scientists. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije i član je Komore biohemičara Srbije. Autor je tri originalna rada objavljena u međunarodnim časopisima.

9. Izjave

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Миљан Савковић

Број индекса 9/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај одређивања хепцидина-25 и одабраних генетских варијанти у лечењу
анемије код пацијената у терминалној бубрежној слабости

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19. 08. 2022.



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Миљан Савковић

Број индекса 09/12

Студијски програм: докторске академске студије – модул медицинска
биохемија

Наслов рада: Значај одређивања хепцидина-25 и одабраних генетских варијанти
у лечењу анемије код пацијената у терминалној бубрежној слабости

Ментор: проф. др sc. Виолета Допсај

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 19.09.2022.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај одређивања хепцидина-25 и одабраних генетских варијанти у лечењу анемије код пацијената у терминалној бубрежној слабости

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве.)

Потпис аутора

У Београду, 19.08.2022.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално– без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.