

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE



**SERUMSKA KONCENTRACIJA
HEPCIDINA KAO POKAZATELJ
REZERVI GVOŽĐA U DECE SA
SIDEROPENIJSKOM ANEMIJOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Jovanka Kolarović

Kandidat: dr Jelena Čulafić

Novi Sad, 2016. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
NAZIV FAKULTETA – MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Čulafić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Jovanka Kolarović, vanredni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Serumska koncentracija hepcidina kao pokazatelj rezervi gvožđa u dece sa sideropenijskom anemijom
Jezik publikacije: JP	srpski/ latinica
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja: 8 / stranica: 120 / slika:12 / grafikona: 20 / tabela: 29/ referenci: 150)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Hematologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	anemija; hepcidini; anemija usled nedostatka gvožđa; dijagnoza; gvožđe; odojčće; adolescenti; biomarkeri
UDK	616.155.194-053.2 612.015.3:546.72
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj tezi finansirana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije – III46005
Izvod: IZ	<p>Anemija predstavlja problem svetskih razmera sa značajnim zdravstvenim, socijalnim i ekonomskim konsekvencama. Iako je pre mnogo godina prepoznata kao javnozdravstveni problem, malo je učinjeno u uspostavljanju kontrole anemije i prevalenca je ostala neprihvatljivo visoka. Deficit gvožđa predstavlja najčešći uzrok anemije, deca uzrasta od 6-24 meseca i adolescenti predstavljaju vulnerabilne grupe. Hepcidin je peptidni hormon niske molekularne težine koji ima ključnu ulogu u metabolizmu gvožđa. Cilj istraživanja je bio da se odredi serumska koncentracija hepcidina kod dece uzrasta od 6 meseci do 2 godine i adolescenata uzrasta od 11 do 19 godina koji boluju od sideropenijske anemije i uporedi sa serumskim koncentracijama hepcidina u kontrolnim grupama, kao i da se utvrdi njegova povezanost sa parametrima metabolizma gvožđa.</p> <p>Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 173 ispitanika, 89 ispitanika koji su bolovali od sideropenijske anemije i 84 ispitanika koji nisu bolovali od sideropenijske anemije i koji su predstavljali kontrolnu grupu. Svim ispitanicima je venepunkcijom uzorkovana krv za određivanje kompletne krvne slike i prametara metabolizma gvožđa. ELISA metodom je određen nivo hepcidina u serumu.</p>

	<p>Ispitivanjem je utvrđeno da je koncentracija hepcidina statistički značajno niža u dece i adolescenata koji boluju od sideropenijske anemije u poređenju sa decom i adolescentima koji ne boluju od sideropenijske anemije. Potvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije serumskog hepcidina i gvožđa u serumu, feritina, srednjeg volumena eritrocita i saturacije transferina, a negativna korelacija između koncentracije serumskog hepcidina i transferina i broja retikulocita. Koncentracija transferina i nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa i broj retikulocita su međusobno u pozitivnoj korelaciji, a korelacija koncentracije transferina sa parametrima saturacija transferina, koncentracije gvožđa i hemoglobina je negativna. Na vrednost serumskog hepcidina ne utiču niti pol niti uzrast ispitanika što ga čini senzitivnijim pokazateljem stanja gvožđa u organizmu i pouzdanijim biološkim markerom u dijagnostici sideropenijske anemije.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	17.4.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jelena Čulafić
Mentor: MN	Jovanka Kolarović, M.D., Ph.D., Faculty of Medicine Novi Sad
Title: TI	Serum concentration of hepcidin as an indicator of iron reserves in children with iron deficiency anemia
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	english / serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	chapters: 8/ pages: 120 / pictures: 12 / graphics: 20 / tables: 29 / literature: 150.
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Hematology
Subject, Key words SKW	Anemia; Hepcidins; Anemia, Iron Deficiency; Diagnosis; Iron; Infant; Adolescent; Biomarkers
UC	616.155.194-053.2 612.015.3:546.72
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	Researches in this thesis were funded by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia – III46005
Abstract: AB	Anemia represents a worldwide problem which leads to substantial health, social and economic issues. Although it was identified as a common health problem many years ago, not a lot has been done in controlling anemia and its prevalence has stayed unacceptably high. The iron deficit is the most frequent cause of anemia, 6-24 month-old children and adolescents are vulnerable groups. Hepcidin is a peptide hormone of a low molecular weight which has a main role in the iron metabolism. The aim of the research was to determine the serum concentration of hepcidin in children aged from 6 months to 2 years and in adolescents from the age of 11 to 19 which suffer from iron deficiency anemia and compare it with the serum concentration of hepcidin in the control groups, as well as to determine its connection with the parameters of the iron metabolism. The research included 173 examinees, 89 of them suffered from iron deficiency anemia and 84 did not suffer from iron deficiency anemia. The latter represented the control group. All the examinees had their blood sampled intravenously in order for full blood count results and parameters of iron metabolism to be determined. Also, ELISA method was used for establishing the level of hepcidin in the serum. The research showed that

	<p>the concentration of hepcidin is statistically lower in children and adolescents who suffer from iron deficiency anemia in comparison with children and adolescents who do not have this condition. The positive correlation between the level of serum hepcidin and iron in the serum, ferritin, the medium volume of erythrocytes and transferrin saturation was confirmed but the negative one occurred in the level of the serum hepcidin, transferrin and reticulocyte. Transferrin and the unsaturated capacity of iron binding, the total capacity of iron binding and reticulocytes are in a positive correlation but the correlation of transferrin with the parameters of transferrin saturation, iron and hemoglobin is negative. The sex and the age of the examinees do not influence the level of serum hepcidin which makes it a more sensitive indicator of the level of iron in the body. Besides this, serum hepcidin is a reliable biological marker in the iron deficiency anemia diagnosis.</p>
Accepted on Senate on: AS	17.4.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Jovanki Kolarović na velikoj podršci i neiscrpnj energiji koju je uložila tokom procesa izrade disertacije.

Zahvaljujem se kolektivu Odeljenja za hematoonkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, na razumevanju i pomoći pri odabiru pacijenata, a posebnu zahvalnost dugujem medicinskoj sestri Smiljani Janković na bezrezervnoj pomoći i ličnom angažovanju tokom sprovođenja istraživanja.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Aleksandri Stojadinović na svim stručnim i veoma korisnim savetima i sugestijama, koji su značajno unapredili i obogatili ovaj rad.

Dr Mariji Bodroži Solarov i doc. dr Veliboru Čabarkapi dugujem iskrenu i duboku zahvalnost na ukazanom poverenju, predivnoj saradnji, stručnoj i prijateljskoj podršci.

Zahvaljujem se dr Latu Pezu na obradi rezultata i razvoju matematičkih modela prikazanih u ovoj tezi.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Dunji i Novu na podršci, razumevanju i stalnom podsećanju na to da odustajanje nije opcija. Njima posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

LISTA SKRAĆENICA:	X
1. UVOD.....	1
1.1. SINTEZA HEMOGLOBINA	2
1.2 ANEMIJA.....	4
1.2.1 Definicija	4
1.2.2 Prevalencija.....	4
1.2.3 Podela anemija.....	5
1.3 SIDEROPENIJSKA ANEMIJA	6
1.3.1 Uzroci sideropenijske anemije.....	6
1.3.2 Patofiziologija sideropenijske anemije.....	9
1.3.3 Klinička slika	10
1.3.3.1 Neurološke manifestacije deficita gvožđa	12
1.3.3.1.1 Respiratorne afektivne krize.....	12
1.3.3.1.2 Moždani insult.....	12
1.3.3.1.3 Pseudotumor mozga	12
1.3.3.1.4 Paraliza kranijalnih nerava	13
1.3.3.2 Uticaj deficita gvožđa na biohemijske procese u nervnom sistemu.....	13
1.3.3.3 Uticaj deficita gvožđa na imunološki sistem.....	14
1.3.3.4 Uticaj deficita gvožđa na radnu sposobnost.....	14
1.4 DIJAGNOSTIKA ANEMIJE	15
1.5 DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA SIDEROPENIJSKE ANEMIJE	15
1.6 LEČENJE SIDEROPENIJSKE ANEMIJE	17
1.6.1 Peroralna primena preparata gvožđa.....	17
1.6.2 Parenteralna primena preparata gvožđa	18
1.7 PREVENCIJA SIDEROPENIJSKE ANEMIJE	18
1.8 METABOLIZAM GVOŽĐA	20
1.8.1 Regulacija apsorpcije gvožđa.....	23
1.8.2 Regulacija transporta gvožđa	24
1.9 HEPCIDIN.....	27
1.9.1 Sinteza hepcidina	27
1.9.2 Struktura hepcidina.....	29
1.9.3 Mehanizam dejstva hepcidina	29
1.9.4 Mehanizam regulacije hepcidina	31
1.9.4.1 Uticaj gvožđa na regulaciju hepcidina	32
1.9.4.2 Uticaj hipoksije na regulaciju hepcidina	33
1.9.4.3 Uticaj inflamacije na regulaciju hepcidina	35
1.9.4.4 Uticaj ostalih činilaca na regulaciju hepcidina	36
1.9.5 Bolesti udružene sa poremećajem koncentracije hepcidina	37
1.9.5.1 Poremećaji zbog deficita ili rezistencije na hepcidin	37
1.9.5.1.1 Hereditarna hemohromatoza	37
1.9.5.1.2 Anemije sa prevelikim nakupljanjem gvožđa.....	38
1.9.5.2 Poremećaji zbog visokih vrednosti hepcidina.....	38
1.9.5.2.1 Anemija u inflamaciji.....	38
1.9.5.2.2 Anemija sa smanjenim sadržajem i refrakternošću na gvožđe	39
1.9.5.2.3 Anemija u hroničnoj bolesti bubrega	39
1.9.5.2.4 Anemija u malignim bolestima	39
1.9.6 Terapijski potencijal agonista i antagonista hepcidina.....	40
1.9.6.1 Agonisti hepcidina	40
1.9.6.2 Antagonisti hepcidina.....	41
1.9.7 Značaj hepcidina u dijagnostici anemije	43

2. CILJEVI I HIPOTEZE	44
3. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA	45
3.1 HEMOMETRIJSKE ANALIZE	48
3.2 DESKRIPTIVNA STATISTIKA	48
3.3 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI.....	49
3.4 LINEARNI MODEL.....	50
3.5 VEŠTAČKE NEURONSKE MREŽE-ANN MODELI.....	51
4. REZULTATI	56
4.1 REZULTATI BIOHEMIJSKIH ANALIZA	58
4.2 LINEARNI MODEL	89
4.3 MODEL NEURONSKE MREŽE	90
4.4 SIMULACIJA VEŠTAČKIH NEURONSKIH MREŽA	92
4.5 ANALIZA OSETLJIVOSTI.....	93
5. DISKUSIJA	96
6. ZAKLJUČCI	105
7. LITERATURA	107
8. PRILOG.....	119
8.1 PRISTANAK INFORMISANOG ISPITANIKA/RODITELJA	119

LISTA SKRAĆENICA:

- AMP – Antimikrobni peptid
- ANN - Artificial neural network - Veštačke neuronske mreže
- BFGS - Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno
- BMP – Bone morphogenic protein - Koštani morfogeni protein
- CRP – C-reaktivni protein
- CV – Koeficijent varijacije
- Dcyt B – Duodenalni citohrom B
- dF – Broj stepeni slobode
- DMT1 – Divalentni metal jon transporter 1
- DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina
- ELISA - Enzyme linked-immunosorbent assay
- EPO – Eritropoetin
- F – Fisherov test
- Fe-regulated transporter 1 – Gvožđe regulatorni transporter 1
- FPN – Ferroportin
- GABA – Gamma aminobutyric acid – Gama aminobuterna kiselina
- GDF 15 – Growth differentiation factor 15 - Faktor rasta i diferencijacije 15
- GPI – Linked membrane protein - Glikoproteinu sličan membranski protein
- GPR 30 – G-coupled protein 30 - G udruženi protein 30
- HAMP – Hepatic antimicrobial peptide - Hepatični antimikrobni peptid
- Hb – Hemoglobin
- HbF – Fetalni hemoglobin
- Hct- Hematokrit
- HFE – Human hemochromatosis protein - Protein humane hemohromatoze
- HIF – Hypoxia-inducible factor - Hipoksijom indukovani faktor
- HIGHCARE – High altitude cardiovascular research carried - Studija ispitivanja kardiovaskularne funkcije na velikim nadmorskim visinama
- HJV – Hemojuvelin
- HREs – Hypoxia response elements - Elementi odgovora na hipoksiju
- IL-2 – Interleukin 2

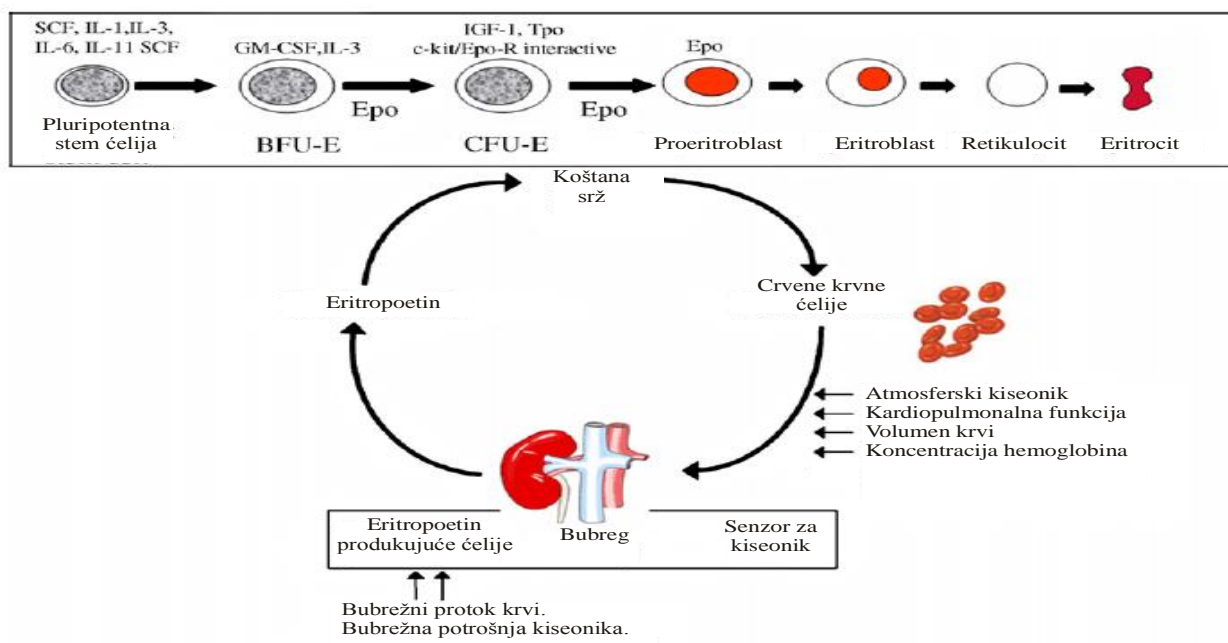
- IL-6 – Interleukin 6
- IRE – Iron regulatory elements - Elementi koji reaguju na gvožđe
- IRP – Iron regulatory proteins - Proteini koji regulišu gvožđe
- JAK – Janus kinaza
- LEAP-1 – Liver expressed antimicrobial peptide 1 - Antimikrobni peptid 1 ekspimiran na jetri
- Max – Maksimum
- MCH – Mean corpuscular hemoglobin - Srednja vrednost hemoglobina u eritrocitu
- MCHC – Mean corpuscular hemoglobin concentration - Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu
- MCV – Mean corpuscular volumen - Srednji volumen eritrocita
- Median – Medijana
- MHC – Major Histocompatibility Complex - Glavni histokompatibilni kompleks
- Min – Minimum
- MLP - Multi-layer perceptron - Višeslojni perceptron modeli
- mRNA – Mesendžer ribonukleinska kiselina
- MTP1 – Metal transport protein 1 - Proteinski transporter metala 1
- NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaza
- Nramp2 – Natural resistance –associated macrophage protein 2 - Makrofagni protein 2 udružen sa prirodnom otpornošću
- OD - Optical density- Optička gustina
- p – Nivo statističke značajnosti
- PCA - Principal components analysis – Analiza glavnih komponenti
- RDW – Red cell distribution width - Širina distribucije zapremine eritrocita
- SD – Standardna devijacija
- SOD – Superoxide dismutase - Superoksid dismutaza
- Sr. vred. – Srednja vrednost
- SS – Zbir kvadrata razlike
- STAT – Signal transducer and activator of transcription - Provodnik signala i aktivator transkripcije

- SZO – Svetska zdravstvena organizacija
- TfR – Transferinski receptor
- TGF- β – Transforming growth factor- β - Transformišući faktor rasta β
- TIBC – Total iron binding capacity - Ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa
- TMPRSS6 – Transmembranska serinska proteaza matriptaza – 2
- TNF- α – Tumor necrosis factor - α - Tumorski faktor nekroze α
- Tsat – Saturacija transferina
- TWSG 1 - Twisted gastrulation protein 1 - Izvijani gastrulacioni protein 1
- UIBC – Unsaturated iron binding capacity - Nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa
- Var – Varijansa

1. UVOD

U organizmu odrasle osobe se prosečno nalazi 5 L krvi i oko $5 \times 10^6 / \mu\text{L}$ eritrocita što odgovara ukupnom broju od $2,5 \times 10^{13}$ eritrocita. S obzirom da je prosečni životni vek eritrocita 120 dana, svakog dana se stvori oko 2×10^{11} novih eritrocita, ili $2,3 \times 10^6$ eritrocita svake sekunde da bi se održala potrebna količina u krvi (1). Eritropoeza se odigrava u kostnoj srži gde se iz pluripotentnih matičnih ćelija vrši sinteza prekursora eritrocita (2,3). Različiti stadijumi u sazrevanju se mogu identifikovati na bazi morfologije ćelija i biohemijskih promena u tim ćelijama. Proces sazrevanja proeritroblasta i eritroblasta u prekursore eritrocita odvija se pod stimulativnim dejstvom eritropoetina (EPO) (1).

Eritrociti sadrže veliku količinu hemoglobina (Hb) koja se sintetiše u ranijim fazama, na stadijumu normoblasta u toku procesa sazrevanja. Kada se normoblast popuni hemoglobinom, ćelija gubi nukleus i napušta kostnu srž kao retikulocit. Ova ćelija postepeno u potpunosti gubi mitohondrije, ribosome i time svojstvo deobe i biosinteze proteina. Retikulociti prelaze u cirkulaciju, za 24-35% imaju veći volumen od eritrocita i u narednih 1-2 dana putem proteozomalne degradacije, autofagije i vezikularne egzocitoze, gube $\frac{1}{4}$ volumena i diferenciraju se u eritrocite (Slika 1). U cirkulaciji eritrocit predstavlja visoko specijalizovanu ćeliju sposobnu za osnovnu ulogu transporta kiseonika (4,5).

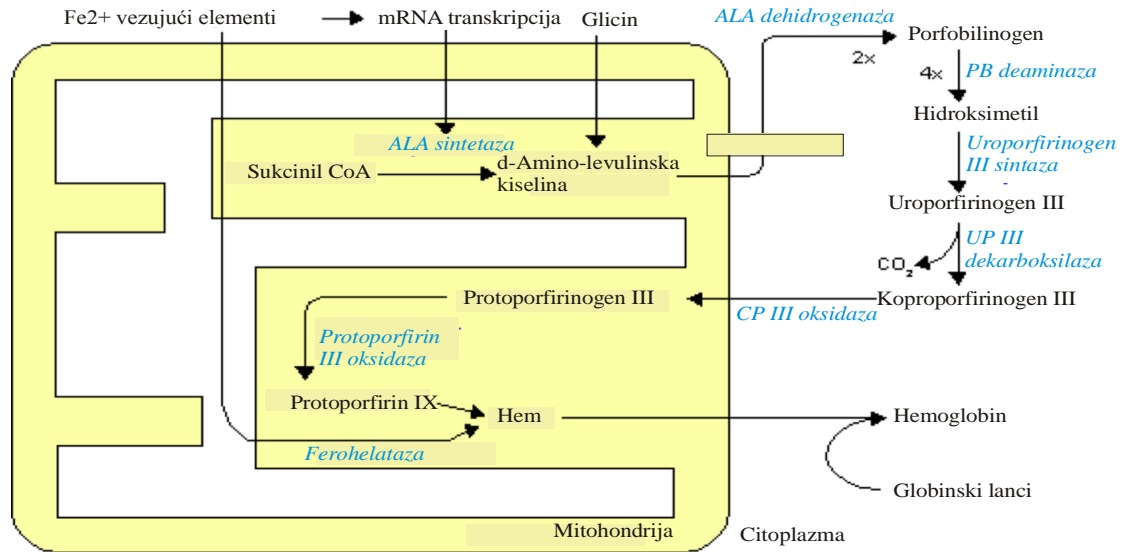


Slika 1. Proces stvaranja eritrocita (Adaptirano iz reference 1).

1.1. SINTEZA HEMOGLOBINA

Hemoglobin je hemprotein globularne strukture koji se sastoji iz četiri polipeptidna globinska lanca. Svaki lanac sadrži u središtu hem koji se sastoji iz protoporfirinskog jezgra i gvožđa u fero obliku. Vezano gvožđe u hemu omogućava oksigenaciju i prenos kiseonika iz pluća do perifernih tkiva (6). U cirkulaciji odraslih dominira HbA koji se sastoji iz 2α i 2β polipeptidna lanca i male količine HbA₂ koji se sastoji iz 2α i 2δ polipeptidna lanca (7). U fetusu postoji najpre embrionalni hemoglobin, dok u kasnijoj fazi razvoja dominira fetalni hemoglobin (HbF) koji se sastoji iz 2α i 2γ polipeptidna lanca. Sinteza globinskih lanaca odvija se tokom eritropoeze na stadijumu eritroblasta. Sinteza α , β , γ i δ globinskih lanaca kodirana je odgovarajućim genima na šesnaestom hromozomu za alfa lance i na jedanaestom hromozomu za non-alfa lance. Uporedo sa sintezom globinskih lanaca odvija se i sinteza hema (8).

Proces sinteze hema (Slika 2) se odvija u citoplazmi i u mitohondrijama u metaboličkom procesu koji obuhvata 8 enzimskih reakcija od prekursora glicina, neesencijalne aminokiseline i sukcinil-KoA, intermedijernih produkata ciklusa limunske kiseline. Sinteza hema se odvija preko sledećih intermedijernih produkata: δ -aminolevulinske kiseline, porfobilinogena, porfirinogena, porfirina do protoporfirina. Poslednju reakciju katalizuje ferohelataza i u njoj se fero jon ugrađuje u protoporfirinsko jezgro. Za proces sinteze hema pored prekursora i gvožđa neophodno je prisustvo vitamina B₆ koji je koenzim za prvu reakciju sinteze δ -aminolevulinske kiseline. U slučaju urođene deficijencije enzima biosinteze hema ili njihove inhibicije određenim agensima dolazi do porfirinopatija, teških poremećaja sa hematološkim i neurološkim simptomima i promenama na koži. U sintezi hema i globinskih lanaca postoji međusobna koordinacija kako bi se izbegla neuravnoteženost u sintezi i nagomilavanje hema, odnosno neodgovarajućih globinskih lanaca. Ovaj proces je regulisan na nivou inicijacije translacije preko odgovarajućih represora i inicijalnih faktora translacije. Poremećaji u sintezi globinskih lanaca dovode do hemoglobinopatija koje mogu biti strukturne, zbog zamene aminokiseline u globinskom lancu, i kvantitativne hemoglobinopatije zbog neadekvatne sinteze globinskih lanaca (4,5,9).



Slika 2. Proces sinteze hemoglobina (10).

1.2 ANEMIJA

1.2.1 Definicija

Anemija se definiše kao koncentracija hemoglobina ispod utvrđenih graničnih (*cut-off*) vrednosti (Tabela 1). Predstavlja problem svetskih razmera sa značajnim zdravstvenim, socijalnim i ekonomskim konsekvencama. Iako je pre mnogo godina prepoznata kao javnozdravstveni problem, malo je učinjeno u uspostavljanju kontrole anemije i prevalencija je ostala neprihvatljivo visoka (11).

Tabela 1. Vrednosti Hb (g/L) koje definišu anemiju (12).

	Zdravi	Blaga anemija	Umerena anemija	Teška anemija
Deca uzrasta 0,5 – 4 godine	≥110	100-109	70-99	<70
Deca uzrasta 5 – 11 godina	≥115	110-114	80-109	<80
Deca uzrasta 12 – 14 godina	≥120	110-119	80-109	<80
Devojke uzrasta >15 godina i žene van perioda trudnoće	≥120	110-119	80-109	<80
Devojke uzrasta >15 godina i žene tokom perioda trudnoće	≥110	100-109	70-99	<70
Muškarci uzrasta >15 godina	≥130	110-129	80-109	<80

1.2.2 Prevalencija

Prema proceni Svetske zdravstvene organizacije (SZO) anemijom je pogođeno 1,62 milijarde ljudi širom sveta, odnosno 24,8% svetske populacije (13,14,15,16,17,18). Najveća prevalencija je zabeležena u Africi, ali se takođe procenjuje da u Jugoistočnoj Aziji oko 315 miliona ljudi boluje od anemije (14). Iako se prevalencija anemije u razvijenim zemljama procenjuje na oko 9%, u zemljama u razvoju ona iznosi 43%. Deca, adolescenti i žene u reproduktivnom periodu predstavljaju najvulnerabilnije grupe (15). Oko 47% dece predškolskog uzrasta, 42% gravidnih žena i oko 30% žena koje nisu gravidne boluju od anemije (15,19). Smatra se da je anemija odgovorna za oko 115 000 slučajeva maternalne smrtnosti i oko 591 000 perinatalne smrtnosti u toku godine (15). Oko 11% muškaraca i 10,2%

žena starosti 65 i više godina boluje od anemije (20). Prema kriterijumima SZO anemija je od niskog javnozdravstvenog značaja ukoliko je prevalenca u opštoj populaciji 5-19,9%, umerenog 20-39,9%, a izuzetnog ukoliko je prevalenca > 40% (11,13,15,21). Prevalencija anemije kod dece uzrasta do 5 godina prema regionima prikazana je u Tabeli 2.

Tabela 2. Prevalencija anemije kod dece uzrasta do 5 godina, prema regionima (18).

Region	Prevalencija (%)
Afrika	64,6
Azija	47,7
Evropa	16,7
Latinska Amerika	39,5
Severna Amerika	3,4
Okeanija	28

1.2.3 Podela anemija

Prema mehanizmu nastanka anemije se dele na:

- Anemije uzrokovane gubitkom krvi – akutni i hronični gubitak krvi.
- Anemije uzrokovane smanjenom eritropoezom – hipoproliferativne anemije.
- Anemije uzrokovane hemolizom – destrukcija eritrocita u periferiji (22).

Na osnovu morfologije anemije se dele na:

- Mikrocitne anemije - ukazuju na izmenjenu sintezu hema ili globina: deficit gvožđa, anemija inflamatorne bolesti, talasemija i srodni defekti u sintezi Hb.
- Normocitne (normohromne) anemije - ukazuju na hipoproliferativni ili hipoplastični mehanizam.
- Makrocitne anemije – ukazuju na defekte u sintezi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Obično su uzrokovane deficitom vitamina B12 i folne kiseline ili negativnim uticajem hemioterapeutskih citoreduktivnih lekova na sintezu DNK (23).

1.3 SIDEROPENIJSKA ANEMIJA

Deficit gvožđa predstavlja najčešći nutritivni deficit (24,25,26). Pogađa veliki broj dece u zemljama u razvoju, dok je u razvijenim zemljama jedini nutritivni deficit od javno zdravstvenog značaja (21,27,28,29,30). Prema izveštaju SZO deficit gvožđa ima oko 3,5 milijarde ljudi (31,32). Može se javiti u dva glavna oblika: apsolutni i funkcionalni. Apsolutni deficit gvožđa nastaje kada su telesne rezerve gvožđa snižene ili iscrpljene, uz snižene vrednosti feritina i procenat saturacije transferina (Tsat) (12). Funkcionalni deficit gvožđa nastaje kada su ukupne telesne rezerve gvožđa normalne ili povećane, vrednosti feritina normalne ili povišene, Tsat niska, ali zbog neadekvatnog snabdevanja kosne srži gvožđem, proces eritropoeze je snižen. Funkcionalni deficit gvožđa se javlja u mnogim akutnim i hroničnim inflamatornim stanjima (12,33). Deficit gvožđa predstavlja najčešći uzrok anemije (17,34). Na osnovu vrednosti hemoglobina u određenoj uzrasnoj grupi, SZO je izvršila podelu anemije na blagu, umerenu i tešku. U uzrasnoj grupi od 6 meseci do 4 godine anemija se deli na blagu ukoliko je vrednost hemoglobina 100-109 g/L, umerenu ukoliko je vrednost hemoglobina 70-99 g/L i tešku ukoliko je vrednost hemoglobina manja od 70 g/L. Kod osoba ženskog pola u periodu adolescencije smatra se da je anemija blaga ukoliko su vrednosti hemoglobina 110-119 g/L, umerena 80-109 g/L i teška ukoliko je vrednost hemoglobina manja od 80 g/L. U grupi adolescenata, anemija je blaga ukoliko je vrednost hemoglobina 110-129 g/L, umerena 80-109 g/L i teška ukoliko je vrednost hemoglobina manja od 80 g/L (12).

Prema procenama SZO, 47% predškolske i 25% školske dece boluje od sideropenijske anemije (21). Deca uzrasta od 6-24 meseca (27,35,36) i adolescenti (37) predstavljaju vulnerabilne grupe.

1.3.1 Uzroci sideropenijske anemije

1. Nedostatak gvožđa u ishrani (nedovoljan unos gvožđa, siromaštvo, malnutricija, vegeterijanska ili veganska ishrana).
2. Povećane potrebe za gvožđem u toku različitih fizioloških stanja (novorođenački period, period intenzivnog rasta, menstrualni gubitak krvi, trudnoća, dobrovoljno davanje krvi, bavljenje sportom)
3. Poremećena apsorpcija gvožđa:

- Primena antagonista histaminskih receptora (H₂), inhibitora protonske pumpe, salicilata, nesterodnih antiinflamatornih lekova
 - Prisustvo helatora u biljnoj hrani koji stvaraju netopive komplekse sa gvožđem
 - Kompeticija sa drugim metalima (bakar, olovo)
 - Pika sindrom, pagofagija
 - Gubitak ili disfunkcija apsorptivnih enterocita
 - Celijakija
 - Unutrašnji defekti enterocita
4. Hronični gubitak krvi
- 4a) Gastrontestinalni trakt:
- Jednjak i želudac (ezofagitis, variksi, hijatus hernija, erozivni gastritis, ulkus, benigni i maligni tumori)
 - Tanko i debelo crevo (parazitoza, enteropatija, Mekelov divertikulum, divertikuloza, regionalni enteritis, ulcerozni kolitis, volvulus, vaskularne malformacije, hemoroidi, benigni i maligni tumori)
- 4b) Genitourinarni trakt
- Meno- i metroragija
 - Hronična infekcija
 - Hematurija (maligne bolesti, nefrolitijaza, upalne bolesti bubrega, uretera i mokraćne bešike)
- 4c) Respiratorni trakt
- Hemoptizije bilo kog uzroka: kongenitalne anomalije respiratornog trakta, endobronhijalne vaskularne anomalije, hronične infekcije, anomalije srčanih zalistaka, maligne bolesti, idiopatska plućna hemosideroza.
- 4d) Drugi gubici krvi
- Trauma
 - Česte flebotomije
 - Velike vaskularne malformacije (12,23,33).

Kvalitativno ili kvantitativno neadekvatan unos gvožđa najčešći je uzrok anemije. Tokom istorije ljudi su se bavili pretežno lovom i glavnu namirnicu u ishrani je predstavljalo

meso. Međutim, vremenom je kultivacija različitih poljoprivrednih kultura zauzela značajno mesto u svakodnevnom životu, te je ishrana cerealijskama dovela do pada bioiskoristljivosti hranjivih materija neophodnih za hematopoezu (gvožđe, vitamin B12, folna kiselina) i pada apsorpcije vitamina C. Na taj način povećao se i unos nutritivnih faktora koji smanjuju bioiskoristljivost ne-hem gvožđa kao što su polifenoli (kafa, čaj, cimet), fitati (celo zrno žitarica, leguminoze) i kalcijum (mlečni proizvodi) (12,15). U mesu 30-70% gvožđa je hem-gvožđe koje se apsorbuje 15-35%. U hrani biljnog porekla gvožđe je u ne-hem obliku koje se apsorbuje manje od 10% (38,39). Uvođenje kravljeg mleka u ishranu u toku prve godine života predstavlja najznačajniji nutritivni faktor rizika u pojavi sideropenijske anemije. Kravlje mleko sadrži male količine gvožđa čija je resorpcija loša (10%). Osim toga, u digestivnom traktu stvara proteinske agregate koji mogu izazvati mikroerozije na crevnoj sluzokoži, što dovodi do okultnog krvarenja i gubitka gvožđa (16,21). U studiji koja je ispitivala učestalost sideropenijske anemije kod odojčadi uzrasta 6 meseci, zabeležena je najniža učestalost anemija od oko 1% kod odojčadi čija je ishrana bila zasnovana na adaptiranim mlečnim formulama obogaćenim gvožđem, oko 15% kod odojčadi koja su bila na prirodnoj ishrani i oko 20% kod odojčadi u čijoj je ishrani najzastupljenije bilo kravlje mleko (38). U novorođenačkom i odojačkom uzrastu, zbog brzog rasta i razvoja, potrebe za gvožđem su deset puta veće nego kod odraslih (40). Riziku od pojave sideropenijske anemije su posebno izložena novorođenčad rođena sa malom porođajnom masom, zbog niskih zaliha gvožđa na rođenju (29). U periodu adolescencije vulnerabilnost za sideropenijsku anemiju je povezana sa intenzivnim fizičkim promenama koje se dešavaju u pubertetu zbog čega se povećavaju potrebe u energiji, mikronutrientima, vitaminima i mineralima. Potrebe za gvožđem se povećavaju više nego dvostruko u periodu polnog sazrevanja usled povećanja volumena krvi, ukupne telesne mase, povećanja mišićne mase i sinteze mioglobina, povećanja respiratornog kapaciteta kao i pojave menstruacije (37,41). Gubitkom 1 ml krvi tokom menstrualnog krvarenja gubi se oko 0,5 mg gvožđa, tako da gubitkom krvi više od 80 ml mesečno, koje se javlja kod oko 10% žena, značajno se povećava rizik za pojavu deficita gvožđa (38). Osobe koje se bave fizičkom aktivnošću takođe imaju veći rizik za pojavu deficita gvožđa, posebno atletičari i plivači, usled hemolize koja je, najverovatnije, uzrokovana snažnim mišićnim kontrakcijama (25). Rezultati nekoliko studija koje su se bavile ispitivanjem prevalencije sideropenijske anemije, ukazuju na značajne faktore rizika kao što su visok natalitet (16), niski

prihodi u domaćinstvu, ženski pol, prve dve godine života, adolescencija, veći broj članova u domaćinstvu, niži stepen obrazovanja roditelja (11). Prevalencija anemija je obrnuto proporcionalna ekonomskom razvoju zemlje. Siromašniji slojevi stanovništva su u većoj meri izloženi faktorima rizika za pojavu anemije i njenih sekvela (15). U zemljama u razvoju česte su parazitarne infekcije čiji su uzročnici *Trichuris trichiura* i *Necator americanus* što uzrokuje okultno crevno krvarenje. Deficit gvožđa takođe može biti posledica poremećene apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Želudačna kiselina je neophodna za redukciju gvožđa iz feri (Fe^{3+}) u fero (Fe^{2+}) oblik nakon čega se može transportovati kroz bazolateralnu membranu enterocita, tako da ahlorhidrija može biti uzrok deficita gvožđa, uglavnom kod starijih ljudi, kod kojih je atrofični gastritis često oboljenje (39). Takođe, atrofija sluzokože kod obolelih od celijačne bolesti i infekcija čiji je uzročnik *Helicobacter pylori* doprinosi nastanku sideropenijske anemije. Infekcija čiji je uzročnik *Helicobacter pylori* smanjuje apsorpciju gvožđa, redukuje bioiskoristljivost vitamina C i može dovesti do mikroerozija sluznice i pojave okultnog krvarenja (33). U periodu trudnoće potrebe za gvožđem su tri puta veće zbog povećanja broja eritrocita, rasta fetusa i placent. Ukoliko je u toku prvog i drugog trimestra trudnoće prisutna sideropenijska anemija, povećava se rizik za prevremeni porođaj, rađanje deteta sa niskom porođajnom masom, smrt u perinatalnom periodu i pojavu deficita gvožđa kod odojčeta nakon četvrtog meseca života (12,33,38). Za razliku od trudnica, dojilje su u manjem riziku da obole od anemije jer koncentracija gvožđa u mleku iznosi samo 0,20-0,80 mg/L, kao i zbog izostanka menstrualnog krvarenja u periodu dojenja (12).

1.3.2 Patofiziologija sideropenijske anemije

Manifestnom obliku sideropenijske anemije prethodi postepeno iscrpljivanje rezervi gvožđa koje prolazi kroz nekoliko faza.

- Faza I (latentna sideropenija)

Gubitak gvožđa premašuje količinu apsorbovanog gvožđa dovodeći do progresivnog smanjivanja uskladištenog gvožđa. Koncentracije hemoglobina i serumskog gvožđa ostaju u opsegu normalnih vrednosti. Smanjuje se koncentracija serumskog feritina jer se gvožđe koristi za sintezu hemoglobina. Uporedo sa smanjenjem tkivnih rezervi gvožđa dolazi do kompenzatornog povećanja sinteze transferina, odnosno ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa

(TIBC-total iron binding capacity) i nezasićenog kapaciteta vezivanja gvožđa (UIBC-unsaturated iron binding capacity).

- Faza II (manifestna sideropenija)

Ispražnjene su rezerve gvožđa koje više ne mogu zadovoljiti potrebe kostne srži. Dok se koncentracija TIBC i UIBC povećava, smanjuje se koncentracija serumskog gvožđa, što dovodi do progresivnog smanjenja količine gvožđa koje je na raspolaganju za eritropoezu. Kada se koncentracija serumskog gvožđa smanji ispod 9 $\mu\text{mol/L}$, a saturacija transferina ispod 15-16% ugrožena je eritropoeza, a zbog poremećaja eritropoeze registruje se snižen broj retikulocita.

- Faza III (sideropenijska anemija)

Anemija sa normalnim morfološkim karakteristikama eritrocita.

- Faza IV

Anemija sa mikrocitozom i hipohromijom (snižene vrednosti eritrocitnih indeksa)

- Faza V

Deficit gvožđa u organizmu uzrokuje tkivnu hipoksiju i smanjenu aktivnost enzima, naročito respiratornih, što dovodi do razvoja simptoma karakterističnih za anemiju (23).

1.3.3 Klinička slika

Klinička slika zavisi od težine i uzroka anemije, uzrasta, komorbiditeta, brzine nastanka anemije. U određenim slučajevima anemija je asimptomatska i dijagnostikuje se nakon laboratorijskog određivanja vrednosti hemoglobina.

Kliničku sliku karakterišu slabost, bledilo, dispneja, tahikardija, palpitacije, klaudikacija, glavobolja, vertigo, razdražljivost, iregularne menstruacije, nedostatak apetita, suva koža, suvi, lomljivi nokti, suva i oštećena kosa, alopecija i koilonihija. Zaravljene papile jezika se javljaju kod pacijenata sa blagim do umerenim deficitom gvožđa i dobar su pokazatelj trajanja deficita. Atrofični glositis se javlja u težim slučajevima. Sindrom nemirnih nogu se, takođe, dovodi u vezu sa deficitom gvožđa (12).

Plummer – Vinson sindrom koji se takođe naziva i *Kelly – Peterson* sindrom je redak i karakteriše ga sideropenijska anemija, disfagija i oštećenje jednjaka. Tačni epidemiološki podaci nisu dostupni, ali analizom prikaza slučajeva došlo se do zaključka da se u 90%

slučajeva javlja kod ženskog pola sa prosečnom starošću od 47 godina u vreme postavljanja dijagnoze. Sindrom je udružen sa povećanim rizikom od pojave skvamoznog ćelijskog karcinoma farinksa i ezofagusa, koji se javlja u 3-15% slučajeva. S obzirom da se deficit gvožđa smatra dominantnim u patogenezi *Plummer – Vinson* sindroma, supstitucija preparatom gvožđa predstavlja glavnu terapijsku opciju. Nije poznata učestalost javljanja svih simptoma i znakova (12,15). Simptomi i znaci sideropenijske anemije prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Simptomi i znaci sideropenijske anemije (12).

Veoma učestali
<ul style="list-style-type: none">• Glavobolja• Slabost• Dispneja• Bledilo
Učestali
<ul style="list-style-type: none">• Vertigo• Atrofični glositis• Sindrom nemirnih nogu• Suva koža• Suvi i oštećeni nokti• Šum na srcu• Tahikardija• Neurokognitivne disfunkcije• Angina pectoris• Difuzna ili lokalizovana alopecija
Retki
<ul style="list-style-type: none">• Hemodinamska nestabilnost• Sinkopa• Koilonihija• <i>Plummer – Vinson</i> sindrom

1.3.3.1 Neurološke manifestacije deficita gvožđa

Uloga gvožđa u centralnom i perifernom nervnom sistemu je opsežno ispitivana u kliničkim i eksperimentalnim studijama. Potvrđeno je da je deficit gvožđa kod dece povezan sa usporenim intelektualnim razvojem, respiratornim afektivnim krizama, ishemijskim moždanim insultom, pseudotumorom mozga i paralizom kranijalnih nerava (42,43).

1.3.3.1.1 Respiratorne afektivne krize

Javljaju se kod oko 27% dece koja boluju od sideropenijske anemije. Benigne su po prirodi, nejasne etiologije, mada se kao mogući uzrok navodi poremećaj regulacije autonomnog nervnog sistema koji preko nerva vagusa dovodi do zastoja rada srca i posledične moždane hipoksije. Anemija se smatra faktorom koji povećava verovatnoću nastanka respiratornih afektivnih kriza, s obzirom da niske vrednosti hemoglobina doprinose nastanku hipoksije mozga (42).

1.3.3.1.2 Moždani insult

Anemija se smatra značajnim faktorom u patofiziologiji insulta (44). Moždani insult u pedijatrijskoj populaciji je redak, javlja se u oko 2-3 slučaja na sto hiljada dece godišnje. Smatra se da nastaje kao posledica trombocitoze koja se javlja u slučaju blagog do umerenog deficita gvožđa. Prema drugoj teoriji deficit gvožđa uzrokuje hiperkoagulabilnost. Mikroцитi povećavaju viskoznost krvi, a time i rizik od nastanka tromboze. Takođe, prolazna hemiplegija i cerebelarni infarkt mogu biti povezani sa hipoksijom koja se javlja kao posledica anemije (42).

1.3.3.1.3 Pseudotumor mozga

Mehanizam nastanka pseudotumora mozga nije jasan, ali se smatra da tkivna hipoksija uzrokuje povećanu permeabilnost kapilara i edem mozga, nakon čega nastaje edem papile usled povećanog intrakranijalnog pritiska. Prema drugoj teoriji, poremećaj hemodinamike je uzrok povećanog protoka krvi kroz mozak koji dovodi do povećanog intrakranijalnog pritiska i pojave edema papile. Kod novorođenčadi i odojčadi edem mozga se klinički češće manifestuje kao ispupčena fontanela nego kao edem papile. Promena je reverzibilna nakon supstitucione terapije preparatom gvožđa (42).

1.3.3.1.4 Paraliza kranijalnih nerava

Neurološka abnormalnost koja je takođe posledica deficita gvožđa je i obostrana paraliza VI kranijalnog nerva. Smatra se da nastaje usled povišenog intrakranijalnog pritiska ili fokalne ishemije ponsa (42).

1.3.3.2 Uticaj deficita gvožđa na biohemijske procese u nervnom sistemu

Gvožđe je od izuzetnog značaja za normalan razvoj centralnog nervnog sistema (45) zbog uticaja na mijelinizaciju, energetski metabolizam neurona i glija ćelija i produkciju neurotransmitera (25).

U studijama koje su sprovedene na eksperimentalnim životinjama dokazano je da se deficit gvožđa negativno odražava na razvoj centralnog nervnog sistema, što dovodi do kognitivnih i bihevioralnih abnormalnosti. Zapažena je usporena mijelinizacija i hipomijelinizacija, jer oligodendrociti – mijelin produkujuće ćelije, ne sadrže dovoljnu količinu gvožđa koje im je neophodno za tu aktivnost. Takođe, smanjena je aktivnost enzima uključenih u metabolizam γ -aminobuterne kiseline (GABA) koja je prisutna u svim delovima centralnog nervnog sistema i predstavlja inhibitorski transmitser koji jednim delom učestvuje u oslobađanju hormona iz hipotalamo-hipofizne osovine. Potvrđene su i abnormalnosti u neurotransmisiji dopamina kao i povišene vrednosti serotonina, što za posledicu ima poremećaj ponašanja i smanjenu sposobnost učenja (46,47). Koncentracija fenilalanina u plazmi je povišena u slučaju deficita gvožđa jer je konverzija fenilalanina u tirozin, posredstvom fenilalanin-hidroksilaze, reakcija koja je zavisna od gvožđa. Poliamini, neophodni za pravilan razvoj mozga su sniženi, dok je metabolizam glutationa izmenjen čime je smanjena zaštita mozga od oksidacije (42).

Nekoliko studija je takođe potvrdilo poremećaj kognitivnih i motornih funkcija. Deficit gvožđa dovodi do usporene maturacije kortikospinalnog trakta. Mijelinizacija kortikospinalnog trakta obično počinje u drugom ili početkom trećeg trimestra trudnoće i traje sve do druge ili treće godine života (46). Smatra se da deficit gvožđa može biti uzrok sensorineuralnog gubitka sluha, što bi se moglo objasniti smanjenjem aktivnosti gvožđe zavisnih enzima u kohleji i promenama u funkciji stereocilija, ili nastaje kao posledica neadekvatne mijelinizacije (42). Biohemijski poremećaji u nervnom sistemu zbog deficita gvožđa prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Biohemijski poremećaji u nervnom sistemu zbog deficita gvožđa (42).

Transmitter	Metabolički efekti	Klinički efekti	Reverzibilnost
GABA	GABA +/-	Poremećaj regulacije puteva koji učestvuju u ponašanju	Ireverzibilno kod deficita gvožđa tokom gestacije
Dopamin	Smanjen afinitet D2 receptora	Snižena motorna aktivnost i usporeno učenje	Ireverzibilno (dokazano na animalnom modelu)
Fenilalanin	Povećana koncentracija	Efekat kao kod fenilketonurije	Reverzibilno
Serotonin	Snižen 5-hidroksitriptofan	Oštećen neurološki razvoj	Ireverzibilno

1.3.3.3 Uticaj deficita gvožđa na imunološki sistem

Deficit gvožđa povećava rizik za razvoj infekcija s obzirom na činjenicu da smanjuje aktivnost neutrofila i pogoršava intraćelijsku baktericidnu aktivnost. Takođe, smanjuje broj i funkciju T-ćelija, aktivnost ćelija ubica, produkciju interleukina-2 (IL-2) i faktora koji dovode do migracije makrofaga. Hronična mukokutana kandidijaza i *Helicobacter pylori* infekcija se češće javljaju kod dece koja imaju snižene vrednosti serumskog gvožđa. U nekim studijama je potvrđeno da je deficit gvožđa češće udružen sa crevnim, respiratornim infekcijama i zapaljenjem srednjeg uha kod dece (22,47).

1.3.3.4 Uticaj deficita gvožđa na radnu sposobnost

Veza između deficita gvožđa i radne sposobnosti je opsežno istraživana. Uloga gvožđa u transportu kiseonika do mišića i njegova uloga u različitim metaboličkim procesima, objašnjava na koji način deficit gvožđa redukuje radnu sposobnost. U zemljama u razvoju u kojima fizički rad dominira, smanjenje radnog učinka ima značajne ekonomske konsekvence (15).

1.4 DIJAGNOSTIKA ANEMIJE

Dijagnoza sideropenijske anemije se zasniva na prisustvu određenih simptoma i znakova i rezultatima laboratorijskih analiza. Laboratorijske analize se dele na osnovne hematološke analize kojima je moguće utvrditi prisustvo anemije i specifične biohemijske i hematološke analize koje imaju za cilj da otkriju uzrok anemije (5).

Prvi dijagnostički nivo podrazumeva određivanje kompletne krvne slike: broj eritrocita, Hb, hematokrit (Hct), srednja zapremina eritrocita (MCV, Mean corpuscular volumen), srednja vrednost količine Hb u eritrocitima (MCH, Mean corpuscular hemoglobin), srednja vrednost koncentracije Hb u eritrocitima (MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration), širina distribucije zapremine eritrocita (RDW, Red cell distribution width).

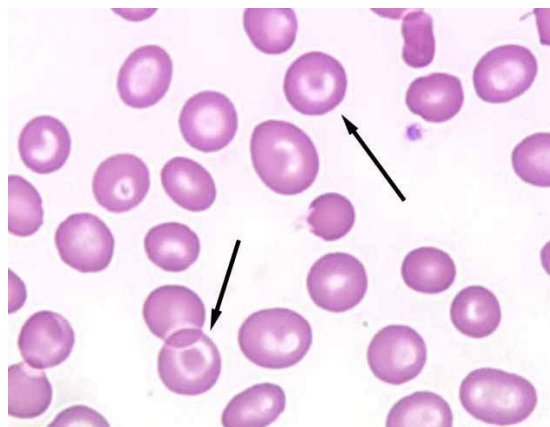
Drugi dijagnostički nivo podrazumeva ispitivanje morfoloških karakteristika eritrocita u razmazu periferne krvi i broj retikulocita.

Treći dijagnostički nivo podrazumeva određivanje koncentracije serumskog gvožđa, UIBC, TIBC, feritina, vitamina B12, folne kiseline.

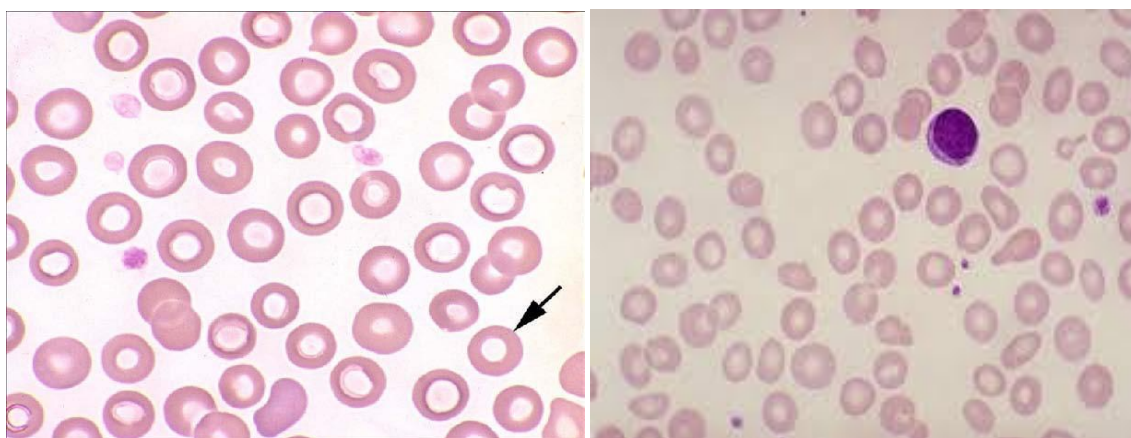
Jednostavnim dijagnostičkim postupkom (prvi i drugi dijagnostički nivo) moguće je kod 80% bolesnika racionalno usmeriti dijagnostički postupak i vrlo brzo utvrditi morfološki tip anemije. Uključivanjem trećeg dijagnostičkog nivoa laboratorijske obrade kod gotovo svih bolesnika se postavi dijagnoza tipa anemije (12,23).

1.5 DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA SIDEROPENIJSKE ANEMIJE

Diferencijalno dijagnostički u obzir dolazi β talasemija minor i anemije u toku hroničnih bolesti. Beta talasemiju minor karakteriše mikrocitna anemija sa umereno sniženom koncentracijom Hb, povišenim brojem eritrocita i izraženom mikrocitozom. Dijagnoza se postavlja na osnovu elektroforeze Hb, koncentracije HbF i A2 frakcije Hb, koji je kod ovih bolesnika povišeni (48). Karakteristična je morfologija eritrocita koji se nazivaju target ćelije (Slika 3). Nalaz centralnog zasenčenja u eritrocitima se ne nalazi kod zdravih osoba (Slika 4), kao ni kod obolelih od sideropenijske anemije (Slika 5).



Slika 3. Target eritrociti u β talasemiji (49).



Slika 4. Eritrociti normalne morfologije (49).

Slika 5. Eritrociti u sideropenijskoj anemiji (49)

Anemija u toku hroničnih oboljenja nastaje kao posledica aktivacije imunskog sistema i posredovana je inflamatornim citokinima, koji dovode do ubrzane hemolize, smanjenog proliferativnog odgovora eritroblasta na EPO i slabijeg mobilisanja gvožđa iz depoa u jetri i retikuloendotelijalnom sistemu. Karakteriše je normohromna, a ređe hipohromna mikrocitna anemija. Koncentracija gvožđa u serumu je snižena, a feritina povišena. Ovaj oblik mikrocitne anemije nalazi se u toku akutnih i hroničnih infektivnih bolesti, zatim kod sistemskih bolesti vezivnog tkiva i u toku imunog odgovora na limfome i neoplazme mezenhimalnog porekla (48).

1.6 LEČENJE SIDEROPENIJSKE ANEMIJE

Cilj lečenja anemije je ubrzana normalizacija koncentracije hemoglobina u krvi i popunjavanje rezervi gvožđa u organizmu kako bi se poboljšao kvalitet života i prognoza mnogih hroničnih oboljenja kod kojih se javlja sideropenijska anemija (12).

1.6.1 Peroralna primena preparata gvožđa

Preparati gvožđa se mogu primenjivati u cilju prevencije sideropenijske anemije u rizičnim populacijama ili u lečenju pacijenata sa dokazanom anemijom (12).

Najlakši i najsigurniji način nadoknade gvožđa je primena peroralnih preparata gvožđa koji sadrže gvožđe u dvovalentnom i trovalentnom obliku. Od lekova koji sadrže gvožđe u dvovalentnom obliku najčešće se primenjuju ferosulfat, ferogluconat i ferofumarat, a od oblika sa trovalentnim gvožđem u upotrebi su ferihidroksi-polimaltozat i feriproteinsukcinilat. Terapijska doza kod dece izrasta do 12 godina iznosi 3-6 mg/kg/dan, dok kod odraslih dnevna doza treba da sadrži 200 mg elementarnog gvožđa. Preparate gvožđa bi trebalo davati između obroka uz primenu askorbinske kiseline koja može poboljšati intestinalnu apsorpciju gvožđa. U slučaju pojave neželjenih efekata, gvožđe bi trebalo primenjivati u toku obroka, ali se na taj način apsorpcija smanjuje za 40% (12,33).

Terapijski test gvožđem se zasniva na praćenju hematoloških parametara koncentracije hemoglobina po uvođenju gvožđa u terapiju. Mesec dana nakon započinjanja terapije peroralnim preparatom gvožđa, vrednosti koncentracije hemoglobina bi trebalo da budu više najmanje za 10 g/L. Takođe, nakon 5 do 7 dana terapije gvožđem dolazi do porasta broja retikulocita. Ukoliko je terapijski test gvožđem negativan treba proširiti dijagnostiku, ako je moguće uticati na uzrok i nastaviti terapiju. Razlozi za negativan terapijski test gvožđem su nepridržavanje terapije, malapsorptivni sindromi, krvarenja, kao i pridružene infektivne, inflamatorne i maligne bolesti. Ukoliko je test pozitivan, lečenje treba nastaviti da bi se popunili depoi bar dva meseca nakon normalizacije vrednosti hemoglobina, što ukupno čini najčešće tri do pet meseci (12).

Najčešće neželjene reakcije nakon peroralne primene preparata gvožđa su od strane gastrointestinalnog trakta (mučnina, bolovi u abdomenu, dijareja, opstipacija). Gvožđe deluje iritantno na sluzokožu gastrointestinalnog trakta što je direktno proporcionalno količini

slobodnog gvožđa u preparatu. Primenom preparata gvožđa pred spavanje, kada je motilitet gastrointestinalnog trakta najmanji, mogu se umanjiti tegobe bolesnika. Neželjene reakcije se javljaju kod 20-30% pacijenata i odgovorne su za veoma lošu komplijansu. U nekim studijama je dokazano da niže doze gvožđa, zbog bolje tolerancije, daju bolji terapijski odgovor (12,23,34).

1.6.2 Parenteralna primena preparata gvožđa

Preparate gvožđa parenteralnim putem treba primenjivati samo kada za to postoje jasne indikacije i kada nije moguća oralna primena, zbog rizika od pojave ozbiljnih i po život opasnih reakcija koje se javljaju kod 0,2 do 3% pacijenata.

U upotrebi je šest različitih oblika gvožđa za parenteralnu primenu: gvožđe sukroza, feriglukonat, ferikarboksimaltoza, gvožđe izomaltozid, ferumoksitol i gvožđe dekstran (niskomolekularna forma). Kako intravenska primena zaobilazi problem intestinalne apsorpcije, povećanje vrednosti hemoglobina je mnogo brže nego kod primene oralnih preparata (12,33).

1.7 PREVENCIJA SIDEROPENIJSKE ANEMIJE

Sa prevencijom deficita gvožđa kod žena u generativnom periodu treba započeti još pre trudnoće. Anemija u trudnoći se definiše kao vrednost hemoglobina ispod 110g/l, a uz vrednost feritina ispod 16 µcg/l predstavlja indikaciju za terapiju preparatima gvožđa. Kod novorođenčeta rođenog u terminu sa telesnom masom od 3000g i više rezerve gvožđa su dovoljne tokom prvih četiri do šest meseci života. Profilaksa je neophodna u odojčadi, i to 1 mg/kg, maksimalno 10 mg za donesenu decu od navršenog šestog meseca, ako su na prirodnoj ishrani, i od navršenog četvrtog meseca ako su na ishrani kravljim mlekom. Ako dete dobija adaptirano mleko, treba oduzeti od ove doze gvožđe koje se već nalazi u mleku. Američka akademija za pedijatriju u preporukama od 1992. godine preporučuje profilaksu od četvrtog meseca čak i za dojenju decu. Kod nedonoščadi potrebne su veće doze i to od navršenog drugog meseca života: 2 mg/kg, maksimalno 15 mg, ako su rođena sa više od 1500 g, a 3 i 4 mg/kg ako su rođena sa manje od 1500 g, odnosno manje od 1000 g. Blizanci, slično kao i prematurusi, imaju povećanu potrebu za gvožđem. U trenutku kada se započne profilaksa nije potrebna analiza krvne slike niti bilo koja druga analiza, ako se radi o zdravom detetu.

Profilaksa se sprovodi do kraja prve godine života (50). Preporuke za unos gvožđa prema polu i uzrastu u odnosu na stepen bioiskoristljivosti gvožđa prema SZO prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Preporuke za unos gvožđa prema polu i uzrastu u odnosu na stepen bioiskoristljivosti gvožđa prema SZO (51).

Uzrast	Bioiskoristljivost 15% Fe (mg/d)	Bioiskoristljivost 5% Fe (mg/d)
Deca		
0,5-1 god	6,2	18,6
1-3 god	3,9	11,6
4-6 god	4,2	12,6
7-10 god	5,6	17,8
Muškarci		
11-14 god	9,7	29,2
15-17 god	12,7	37,6
>18 god	9,1	27,4
Žene		
11-14 god (bez menstrualnog krvarenja)	9,3	28,0
11-14 god (sa menstrualnim krvarenjem)	12,5	37,6
15-17 god	20,7	62,0
>18 god	19,6	58,8
Žene u postmenopauzi	7,5	22,6
Žene u periodu laktacije	10,0	30,0

1.8 METABOLIZAM GVOŽĐA

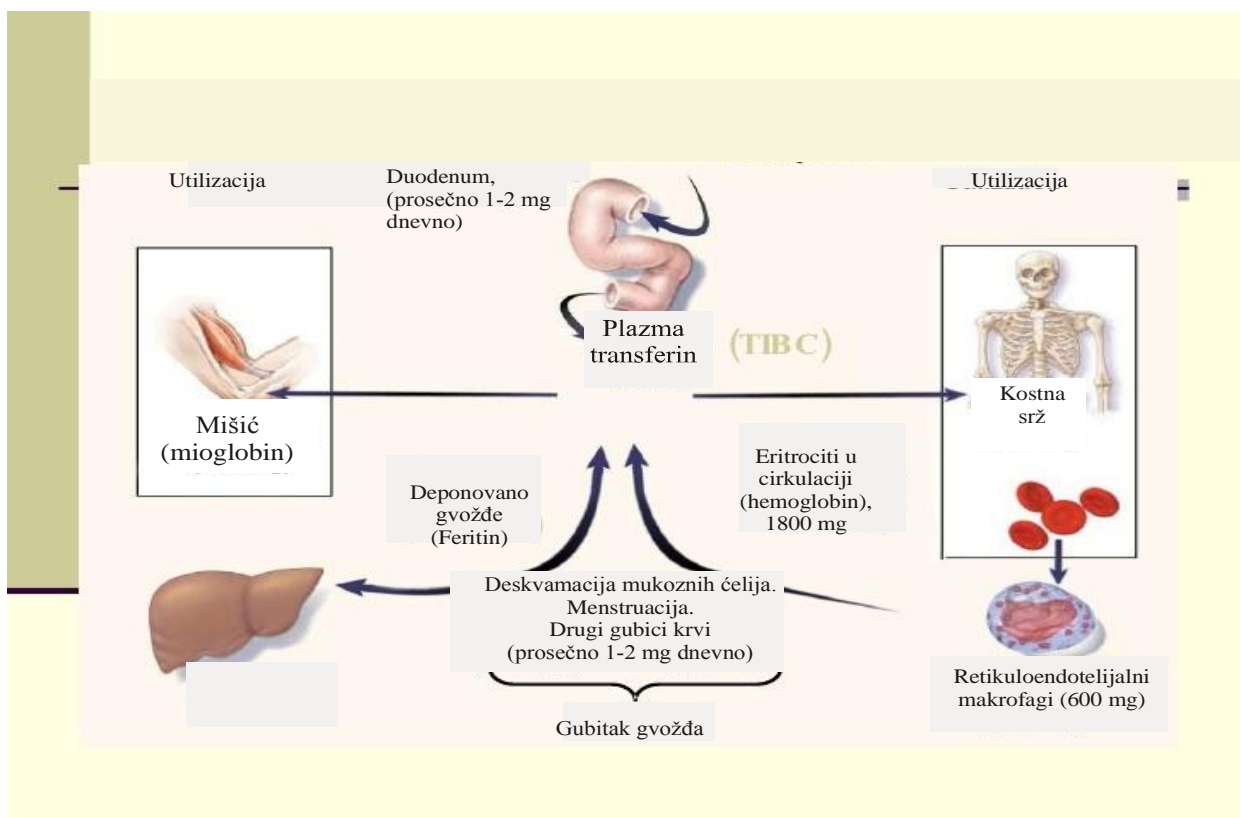
Gvožđe predstavlja najzastupljeniji metal u ljudskom telu, neophodan za očuvanje zdravlja (52,53,54). Hemijske osobine ga čine esencijalnim elementom za brojne biohemijske procese kao što su ćelijska proliferacija, respiracija, metabolizam folata i sinteza DNK (55,56,57,58,59). Gvožđe je neophodno za pravilno funkcionisanje enzima uključenih u metabolizam lekova kao što je citohrom P 450. Predstavlja kofaktor peroksidaza, kao što je katalaza (ključni antioksidantni enzim) i mijeloperoksidaza (enzima uključenih u uništavanje patogena) (60). Međutim, zbog sposobnosti da stvara slobodne radikale, višak slobodnog gvožđa dovodi do oštećenja DNK, proteina i lipida (56,57,58,61,62). Oksidativno oštećenje uzrokovano slobodnim radikalima se smatra uzročnikom oboljenja kao što su ateroskleroza, dijabetes, maligne i neurodegenerativne bolesti (53). Abnormalno visok nivo gvožđa u mozgu dovodi do poremećaja metabolizma gvožđa i neurodegenerativnih promena što se može manifestovati kao Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest i Hallerorden-Spatz sindrom (63). Prema tome, metabolizam gvožđa mora biti precizno regulisan u cilju održavanja vrednosti gvožđa u fiziološkim granicama (64,65).

Različiti endogeni i egzogeni signali aktiviraju ili deaktiviraju molekularne puteve kako bi nivo gvožđa bio u fiziološkim granicama (64). Kontrola homeostaze gvožđa se odvija na ćelijskom i sistemskom nivou (66).

Ćelijski metabolizam gvožđa se održava na nivou unosa, deponovanja, efluksa i intraćelijske distribucije gvožđa (56,64). Na nivou ćelije, mehanizam regulacije se odvija preko post-transkripcione regulacije glavnih gena povezanih sa gvožđem. Proteini koji regulišu metabolizam I količinu gvožđa u ćelijama javljaju se u dva oblika kao IRP1 i IRP2 (IRP - Iron regulatory proteins). IRP1 i IRP2 su homologni proteini sa 56% identičnih sekvenci. IRP2 ima dodatno cisteinom bogato područje nepoznate funkcije. Ekspresija IRP1 je dominantna u bubrezima, jetri i mrkom masnom tkivu, dok je ekspresija IRP2 dominantna u centralnom nervnom sistemu (65). Kada je nivo citoplazmatskog gvožđa nizak, IRP1 i IRP2 se vezuju za elemente koji reaguju na gvožđe (IRE - Iron regulatory elements), koji predstavljaju delove RNA gena povezanih sa metabolizmom gvožđa (66,67). Do povećanog vezivanja IRP i IRE dolazi u slučaju nedostatka gvožđa i hipoksije, a vezivanje suprimiraju gvožđe i O₂ (65,68).

Sistemska homeostaza gvožđa je regulisana deponovanjem i mobilizacijom gvožđa, prvenstveno iz jetre, u cilju zadovoljenja potreba eritropoeze. Retikuloendotelni sistem razgradnjom ostarelih eritrocita dovodi do oslobađanja gvožđa koje se dalje koristi u procesu eritropoeze. Regulacija intestinalne apsorpcije gvožđa iz hrane je ključna za održavanje homeostaze jer kod ljudi ne postoji fiziološki način ekskrecije gvožđa i ono se može dodatno gubiti samo krvarenjem. U cilju očuvanja sistemske homeostaze gvožđa, komunikacija između ćelija za čiju sintezu je neophodno gvožđe (eritroidnih prekursora), depoa gvožđa (hepatocita i tkivnih makrofaga) i ćelija koje apsorbuju gvožđe iz hrane (duodenalnih enterocita) mora biti precizno regulisana (56,59). Najvažniju ulogu u sistenskoj regulaciji gvožđa ima hepcidin (64).

Novorođenče se rađa prosečno sa oko 270 mg gvožđa (69), dok se u organizmu odraslog čoveka nalazi 3-4 g gvožđa, što odgovara koncentraciji od 50 mg po kilogramu telesne mase kod muškaraca i 40 mg po kilogramu telesne mase kod žena (69,70). Ova razlika je uslovljena manjom količinom rezervnog gvožđa, nižom koncentracijom hemoglobina i manjim vaskularnim volumenom u odnosu na muškarce. Oko 2/3 telesnog gvožđa se nalazi u sastavu hemoglobina u eritroidnim prekursorima i eritrocitima u cirkulaciji. Oko 300 mg gvožđa se nalazi u mioglobinu, a ostatak u citohromima i enzimima koji sadrže gvožđe (2,71). Transportno gvožđe, vezano za transportni protein transferin, predstavlja mali deo (3 mg) ukupnog telesnog gvožđa. Preostalo gvožđe u organizmu predstavlja deponovano gvožđe u obliku feritina i hemosiderina (71). U parenhimnim ćelijama jetre se nalazi oko 1000 mg, u retikuloendotelnim makrofagima 600 mg, a u kostnoj srži 300 mg gvožđa (23,68). Distribucija gvožđa u organizmu prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Distribucija gvožđa u organizmu (Adaptirano iz reference 23).

Feritin predstavlja multimerni protein sferičnog oblika i sadrži oko 4500 atoma gvožđa. Takođe je prisutan kod životinja, biljaka, gljivica i bakterija (66,70). Sastoji se od dve strukturno slične, ali funkcionalno različite subjedinice: L-subjedinice (19 kDa) koja ima ferooksidaznu aktivnost i H-subjedinice (21 kDa) koja doprinosi stabilizaciji atoma gvožđa u feritinsko jezgro (61,64,70). Glavna funkcija feritina unutar ćelije je zaštita ćelije od toksičnog dejstva gvožđa (66). Lokalizovan je u ćelijskom citosolu, jedru i mitohondrijama, ali je takođe prisutan i u serumu (59). Najveći depoi feritina su jetra, slezina i skeletna muskulatura. Poreklo serumskog feritina nije precizno utvrđeno, iako studije sprovedene na životinjama ukazuju da uglavnom potiče iz jetre (2,71). Gvožđe iz feritina može da se oslobodi posle redukcije, tako da feritin predstavlja ne samo depo nego i izvor gvožđa za potrebe metabolizma. Nivo serumskog feritina se smatra najboljim neinvazivnim testom u dijagnostici deficita gvožđa jer je njegova koncentracija proporcionalna nivou telesnog gvožđa (34). Senzitivnost ovog testa je smanjena u slučaju infekcije ili inflamacije jer feritin predstavlja pozitivni reaktant akutne faze (30,72,73). Kod velikog viška gvožđa veći deo feritina u

tkivima se konvertuje u hemosiderin. To je nerastvorljivi, kompleksni derivat feritina koji je delimično deproteinizovan i agregiran. Sadržaj gvožđa u hemosiderinu je veći, ali je mobilizacija mnogo sporija nego iz feritina (5).

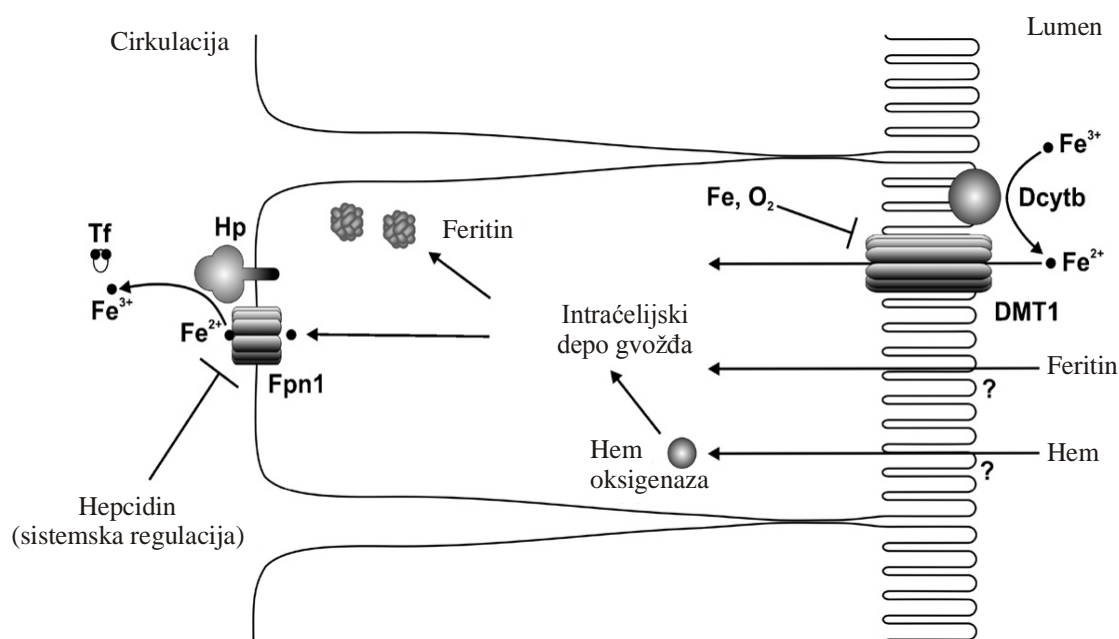
1.8.1 Regulacija apsorpcije gvožđa

Kao odgovor na lošu bioiskoristljivost gvožđa, ljudi i životinje su razvili efikasan mehanizam u cilju očuvanja telesnog gvožđa (3,74). Količina gvožđa u organizmu primarno je kontrolisana regulacijom procesa apsorpcije (Slika 7). Gvožđe se ekskretuje uglavnom putem ekfolijacije enterocita, manjim delom deskvamacijom kože i urinom, dok je kod žena glavni put ekskrecije gvožđa putem menstrualnog krvavljenja (60,75). Dnevni gubitak gvožđa od 1 do 2 mg predstavlja manje od 0,1% ukupne količine gvožđa u organizmu koje mora biti nadoknađeno ishranom kako bi se očuvao balans (3,66). Putem ishrane dnevno se unese oko 10-20 mg gvožđa od čega se apsorbuje 5-10%, odnosno oko 1 mg (70). Unos od 1 mg je dovoljan za muškarce i žene u postmenopauzi. U toku reproduktivnog perioda ženama je neophodno i do 2 mg gvožđa na dan zbog menstrualnog krvavljenja. Povećane dnevne potrebe za gvožđem od 3 ili 4 mg kod trudnica i dojilja postoje zbog trošenja gvožđa za rast fetusa tokom trudnoće, krvavljenja u toku porođaja ili zbog laktacije, čime se troši prosečno 900 mg gvožđa. U takvim slučajevima, u kojima su potrebe veće ili depoi smanjeni, proces apsorpcije je povećan (5). Dnevne potrebe zavise od pola, uzrasta i fiziološkog statusa (69).

Gvožđe se u hrani može nalaziti u hem i ne-hem obliku (69,70). Hem gvožđe ima bioiskoristljivost do 30% i njegova apsorpcija u manjoj meri zavisi od drugih nutrijenata. Ne-hem gvožđe koje predstavlja glavni izvor gvožđa u hrani, ima nisku bioiskoristljivost, do 10%, i na njegovu apsorpciju utiču i drugi nutrienti (60). Redukujući agensi kao što su vitamin C i hlorovodinična kiselina povećavaju apsorpciju ne-hem gvožđa (69).

Gvožđe se apsorbuje u gornjem delu duodenuma aktivnim transportom, a izuzetno je moguća apsorpcija i u drugim delovima creva. Resorptivne epitelijalne ćelije duodenuma – enterociti su odgovorni za unos gvožđa u organizam. Apsorpcija gvožđa u intestinumu regulisana je sa dva mehanizma: fiziološkim regulatornim mehanizmima i lokalnim faktorima u gastrointestinalnom traktu. Fiziološki regulatorni mehanizmi zavise od postojećih telesnih depoa gvožđa, prometa gvožđa, hipoksije, postojanja poremećaja gvožđa. Lokalni faktori u gastrointestinalnom traktu su intraluminalni (hemijski oblik gvožđa, pH sredine, kompleksna

jedinjenja gvožđa i precipitacija) i mukozni (anatomski faktori, intestinalna pokretljivost, količina gvožđa u ćelijama mukoze) (5).



Slika 7. Intestinalna apsorpcija gvožđa (Adaptirano iz reference 69).

1.8.2 Regulacija transporta gvožđa

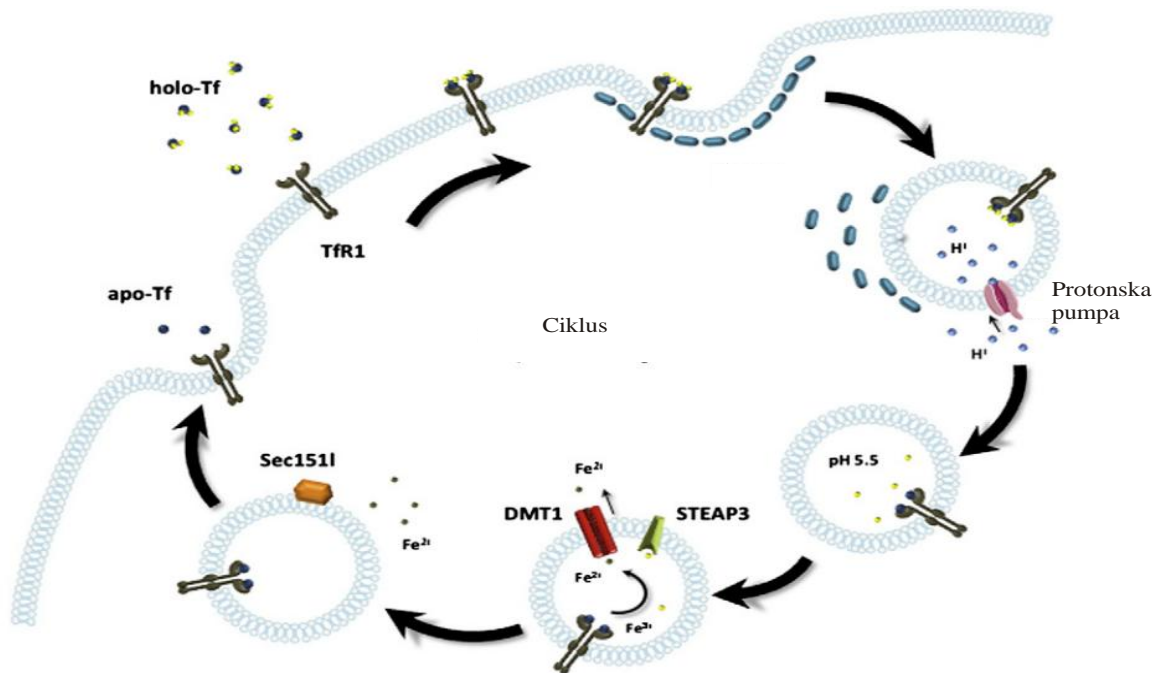
Intestinalni transport svih oblika gvožđa iz lumena creva do cirkulacije se odvija u tri faze: transport kroz apikalnu membranu enterocita, intracelularni transport i transport kroz bazolateralnu membranu enterocita. Mehanizmi transporta gvožđa kroz apikalnu i bazolateralnu membranu su različiti. U tim transportima učestvuju specifični transporter i enzimi koji reaguju na različite nivoe gvožđa u organizmu i time učestvuju u njegovoj homeostazi. Prvi korak, transport kroz apikalnu membranu je različit za hemske i nehemske gvožđe, sve dok se u enterocitima gvožđe ne oslobodi kompleksa sa protoporfirinom, nakon čega oba oblika prolaze kroz slične puteve transporta i metabolizma. U namirnicama biljnog porekla nalazi se nehemske, tj. neorganske gvožđe u fero i feri obliku, a u namirnicama životinjskog porekla gvožđe je u hemskom obliku. Kako je hranom uneto gvožđe najčešće u feri obliku (Fe^{3+}), da bi se koristilo prvo mora biti redukovano u fero oblik (Fe^{2+}) (5). Smatra se da tu reakciju omogućava duodenalni citohrom B (Dcyt B) (61,64,65).

Na apikalnoj površini enterocita se nalazi dvovalentni metal jon transporter 1 - DMT1 (ranije poznat kao Nramp2 – Natural resistance–associated macrophage protein 2) koji predstavlja glavni transmembranski transportni protein. Nije specifičan za gvožđe jer može transportovati različite dvovalentne metalne jone kao što su mangan, kobalt, bakar, cink, olovo. U zavisnosti od potreba organizma, unutar enterocita gvožđe se može vezati sa apoferritinom i uskladištiti kao feritin, ili se prenosi kroz bazolateralnu membranu enterocita u plazmu. Ukoliko su zahtevi za gvožđem mali, ono će ostati u enterocitu, uskladišteno u feritinu, i zajedno sa enterocitom će se deskvamacijom izgubiti iz organizma nakon nekoliko dana. U slučaju velikih zahteva za gvožđem, ono napušta enterocit kroz bazolateralnu membranu, uz pomoć eksportera gvožđa feroportina (FPN) čiji je akcesorni protein hefestin koji oksidiše gvožđe u feri jon. Kada tako nastalo trovalentno gvožđe dospe u cirkulaciju, vezuje se za nosač transferin, što omogućuje dopremanje do kostne srži (3,59,66,69,76).

Transferin predstavlja glikoprotein sastavljen od 679 aminokiselina (64). Najvećim delom stvara se u fetalnoj i adultnoj jetri, ali se manje količine mogu sintetisati u drugim tkivima kao što su mozak i testisi. Nivo mesendžer ribonukleinske kiseline (mRNA) za transferin povećava se tokom fetalnog razvoja, dostiže plato ubrzo nakon rođenja i ostaje visok u odrasлом životnom dobu (68). Transferin je jedan od glavnih transportnih proteina gvožđa (64,66). Može se naći u plazmi u jednom od tri oblika: apotransferin (za koji nije vezano gvožđe), monoferični transferin (za koji je vezan jedan atom gvožđa) i diferični transferin, poznat kao holotransferin (za koji su vezana dva atoma gvožđa) (59). Poluživot transferina kod ljudi iznosi oko 8 dana (68). Normalno samo oko 0,1% ukupnog telesnog gvožđa cirkuliše vezano za transferin. U zavisnosti od toga koliko je gvožđa u određenom trenutku vezano za transferin u plazmi govorimo o zasićenosti transferina. U normalnim uslovima jedna trećina transferina je zasićena gvožđem, pa postoji značajan rezervni kapacitet za vezivanje gvožđa koji se zove nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa. Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa ukazuje na maksimalnu količinu gvožđa koju transferin može da veže (5).

U kostnoj srži transferin se vezuje za specifične membranske receptore za transferin (TfR) na eritroblastima. Nizak pH endozoma uzrokuje konformacione promene u proteinima što dovodi do oslobađanja gvožđa iz kompleksa sa transferinom. DMT1 prenosi gvožđe kroz endozomalnu membranu do citoplazme. Gvožđe se prenosi do mitohondrija gde se ugrađuje u protoporfirin da bi nastao hem. Gvožđe se takođe može naći u citoplazmi u obliku sidero

granula gde se nalazi u kompleksu sa feritinom. Ovi eritroblasti se zovu sideroblasti. Transferin koji je istisnut iz kompleksa sa gvožđem i TfR reciklira do ćelijske površine gde može biti ponovo iskorišćen za sledeće cikluse vezivanja i preuzimanja gvožđa (23,64,65,68). Transferinski ciklus: preuzimanje gvožđa posredstvom kompleksa transferin-transferinski receptor prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Transferinski ciklus: preuzimanje gvožđa posredstvom kompleksa transferin-transferinski receptor (Adaptirano iz reference 68).

Iako je poremećaj regulacije gvožđa prvi put opisan u XIX veku, do nedavno je malo bilo poznato o molekulima uključenim u regulaciju homeostaze gvožđa (77).

Najvažniju regulatornu ulogu u metabolizmu gvožđa ima hepcidin (39,78,79). Otkriće hepcidina je dovelo do eksplozije u istraživanju metabolizma gvožđa, što je dalo nova saznanja i izmenilo razumevanje patofiziologije oboljenja udruženih sa poremećajem nivoa gvožđa u organizmu (3,80).

1.9 HEPCIDIN

Hepcidin predstavlja peptidni hormon niske molekularne težine koji ima ključnu ulogu u metabolizmu gvožđa i odbrani organizma od patogenih mikroorganizama (81,82,83,84). Prvi put je izolovan 2000. godine iz ultrafiltrata plazme i nazvan Antimikrobni peptid eksprimiran na jetri-1 (LEAP -1, Liver expressed antimicrobial peptide-1). Tokom 2001. godine izolovan je iz urina i nazvan Hepatični antimikrobni peptid (HAMP, Hepatic antimicrobial peptide). Danas je poznat kao hepcidin zbog svog hepatičnog porekla i baktericidne aktivnosti (52,80,85).

Hepcidin je cisteinom bogat katjonski, antimikrobni peptid (AMP) koji predstavlja deo urođenog imunog sistema i učestvuje u prvoj liniji odbrane od infektivnih agenasa (53,80). Reaktant je akutne faze tip II i prema aminokiselinskoj sekvenci ne pokazuje sličnost ni sa jednim poznatim AMP, mada strukturno podseća na AMP iz porodice defensina (52,56). Posедуje direktnu antimikrobnu aktivnost, dok degradacijom transmembranskog transportera feroportina (FPN) dovodi do zadržavanja gvožđa unutar ćelija i time smanjuje količinu ovog esencijalnog metala neophodnu za rast mikroorganizama (81,86). Aktivan je protiv Gram pozitivnih (*Bacillus subtilis*) i Gram negativnih (*Neisseria cinerea*) bakterija kao i kvasnica (*Saccharomyces cerevisiae*) (56). Smatra se da hepcidin sintetisan u makrofagima i lokalizovan u fagozomima sprečava pojavu tuberkuloze uzrokujući strukturno oštećenje mikobakterija (77).

1.9.1 Sinteza hepcidina

Hepcidin predstavlja produkt HAMP gena koji je lokalizovan na dugom kraku devetnaestog hromozoma (19q13). Sastoji se od dva introna i tri egzona. Transkripcijom gena nastaje 0,4 kb mRNA, a njenom translacijom prekurzor proteina od 84 amino kiseline, nazvan pre-prohepcidin, koji se oslobađa u citoplazmu. Enzimatskim cepanjem amino kiseline nastaje 64 aminoacidni prohepcidin koji podleže dejstvu enzima konvertaze nakon čega nastaje 25 aminoacidni hepcidin (52,57,80,87,88). Tačna lokalizacija stvaranja 25 aminoacidnog hepcidina nije poznata. Enzim konvertaza bi mogao biti lokalizovan u krvi ili u zidu kapilara (54). Dodatnom aminoterminalnom degradacijom nastaju dve manje izoforme hepcidin-22 i -20 (87). U sprovedenim studijama je potvrđeno da hepcidin-20 ima veću antibakterijsku i antifungalnu aktivnost nego hepcidin-25, posebno pri pH 5. Relativno visok nivo hepcidina-20

je detektovan kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda, kod pacijenata koji imaju anemiju udruženu sa hroničnim oboljenjima, posebno kod onih sa hroničnim oboljenjem bubrega (89). Smatra se da u regulisanju nivoa gvožđa aktivan je isključivo hepcidin-25, što ukazuje da je pet N-terminalnih aminokiselina esencijalno za ovu aktivnost (88,90).

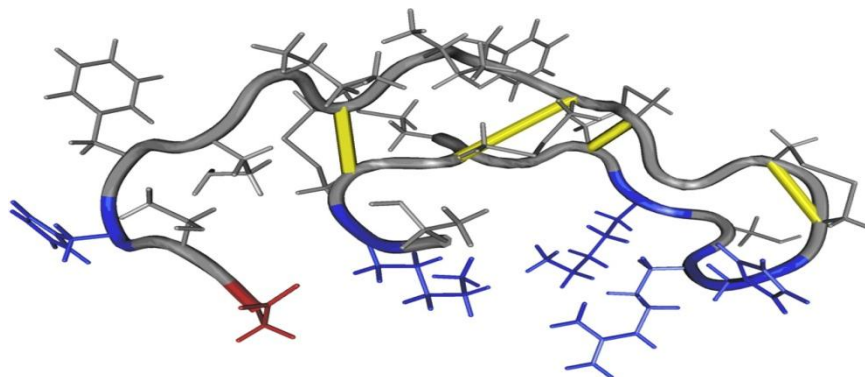
Primarno mesto sinteze hepcidina je jetra (3,52,87,91), dok se u manjoj meri može sintetisati i u spleničnim i alveolarnim makrofagama, monocitima (92), beta ćelijama pankreasa, bubrezima, adipocitima (77), srcu, skeletnim mišićima i mozgu (53,93). Međutim, udeo ekstrahepatičnog hepcidina u cirkulatornom pulu nije poznat i za razliku od jetrenog, ekspresija gena za hepcidin na ovim ćelijskim tipovima je senzitivnija na inflamaciju (interleukin (IL)-6) nego na nivo gvožđa u organizmu. Ekstrahepatični hepcidin bi mogao imati ulogu u lokalnoj kontroli nivoa gvožđa pod određenim stimulusima (67,77). Smatra se da hepatociti predstavljaju primarno mesto sinteze hepcidina zbog blizine portalnog venskog sistema koji im dostavlja najveću količinu gvožđa apsorbovanu iz creva, zatim zbog blizine Kupferovih ćelija u kojima se recikliraju ostareli eritrociti, kao i zbog činjenice da predstavljaju depo gvožđa (3).

Hepcidin cirkuliše u plazmi vezan za α_2 - makroglobulin (68). Zbog slabog afiniteta vezivanja hepcidina za ovaj protein, u fiziološkim uslovima značajan deo hepcidina je slobodan. Osnovni put za eliminaciju hepcidina iz organizma je preko bubrega. Zbog svoje male molekulske mase (oko 2,7 kDa), lako se filtrira kroz glomerularnu bazalnu membranu. Kod osoba sa zdravim bubrezima postoji jasna korelacija između koncentracije hepcidina u urinu i hepcidina koji cirkuliše u plazmi (2,94). Oko 5% hepcidna, koji se filtrira iz plazme, bude izlučen urinom, što ukazuje na mogućnost da se hepcidin reapsorbuje i degradira u ćelijama proksimalnih tubula bubrega. Deo hepcidina eliminiše se iz organizma i preko tkiva koja su bogata feroportinom, degradacijom hepcidin-feroportin kompleksa (95).

Osim kod ljudi, gen za hepcidin je identifikovan i kod drugih kičmenjaka uključujući miševе, pacove, primatе, svinje, pse, goveda, konje, ovce, kamile, golubove, kao i kod nekih vrsta riba (96).

1.9.2 Struktura hepcidina

Spektrometrijskom analizom strukture hepcidina ustanovljeno je da je molekul hepcidina u obliku ukosnice gde su dva kraka spojena pomoću četiri disulfidne veze između molekula cisteina. Neuobičajeno je da se disulfidna veza nalazi na samoj petlji što bi moglo biti odgovorno za veću hemijsku reaktivnost (53). Dve disulfidne veze povezuju paralelne β jedinice hepcidina, a dve održavaju savijenu strukturu ovog proteina. Za vezivanje hepcidina sa njegovim receptorom feroportinom potrebno je angažovanje jedne disulfidne veze. *In vitro* ispitivanja su pokazala da se aktivnost hepcidina ne smanjuje dramatično ako se odstrane pojedine disulfidne veze, tako da je više disulfidnih veza verovatno potrebno za ostvarenje kontakta sa feroportinom (79). Struktura hepcidina je prikazana na Slici 9.



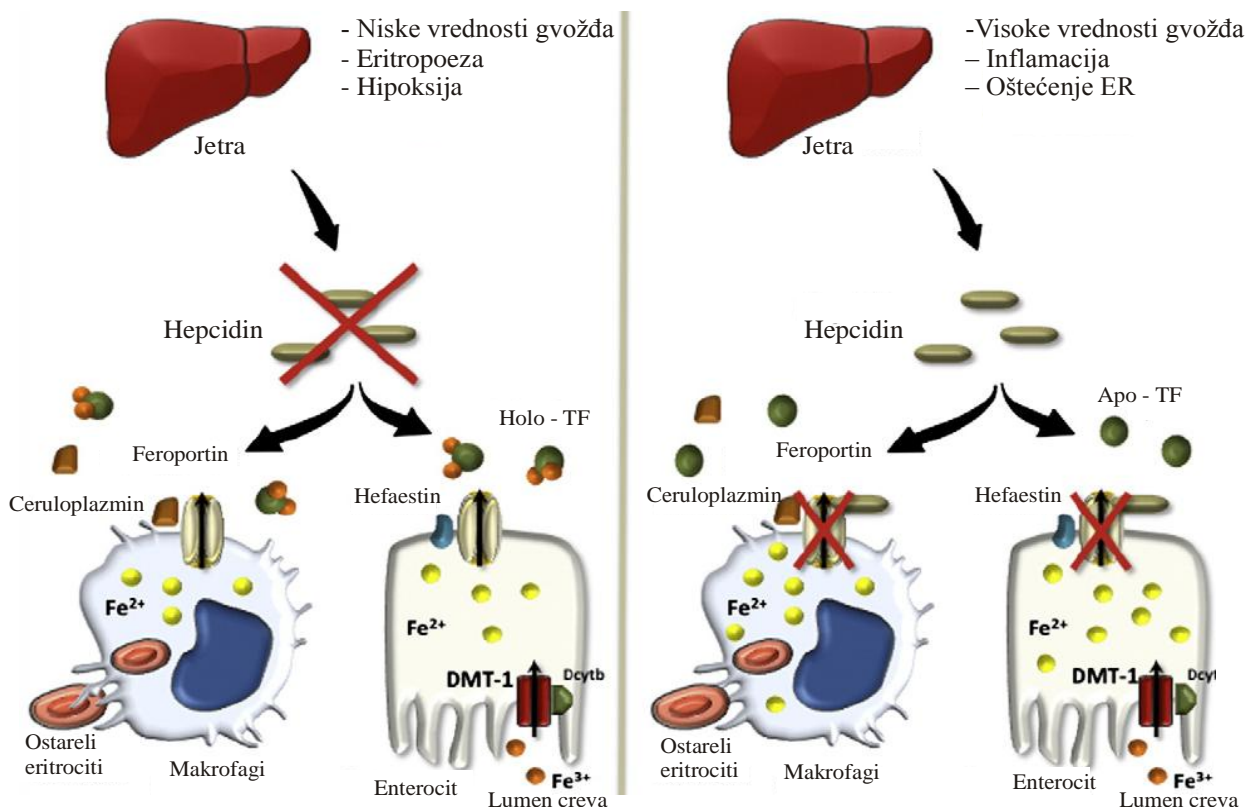
Slika 9. Struktura hepcidina (3).

1.9.3 Mehanizam dejstva hepcidina

Hepcidin se sintetiše kao odgovor na nivo telesnog gvožđa, inflamaciju, hipoksiju i anemiju (52,97,98,99). Pozitivni regulatori sinteze hepcidina su povišene vrednosti gvožđa, infekcija i/ili inflamacija, dok se negativnim regulatorima sinteze hepcidina smatraju deficit gvožđa, anemija, hipoksija i eritropoeza (40,59,66,100). Deluje tako što se vezuje za FPN, takođe poznat kao gvožđe regulatorni transporter 1 (Fe-regulated transporter 1), ili proteinski transporter metala 1 (MTP1, Metal transport protein 1) (83), jedini poznati ćelijski transporter gvožđa koji je prisutan na bazolateralnoj membrani enterocita, hepatocita, makrofaga i sinciotrofoblasta placentе (66,95). FPN predstavlja produkt gena SLC40A1 (80) i sastoji se od 571 amino kiseline (52). Vezivanjem za FPN, hepcidin indukuje njegovu internalizaciju i

degradaciju i na taj način smanjuje intestinalnu apsorpciju gvožđa i oslobađanje gvožđa iz makrofaga (76,90,101). Kada se povećaju potrebe za gvožđem smanjuje se produkcija hepcidina, dolazi do povećane ekspresije FPN na površini ćelija čime se dozvoljava efluks gvožđa u krvotok. Taj mehanizam negativne povratne sprege održava nivo gvožđa u granicama referentnih vrednosti, čime se obezbeđuju dovoljne količine gvožđa za proces eritropoeze i istovremeno sprečava toksično dejstvo ovog metala (80,102).

U toku eksperimentalne studije koja je sprovedena na miševima zabeleženo je da je u grupi miševa kod kojih je odstranjen gen za hepcidin došlo do prekomernog nakupljanja gvožđa, dok je u grupi sa povećanom ekspresijom gena za hepcidin dolazilo do intrauterine smrti fetusa zbog razvoja hipoferemije, što je dovelo do zaključka da hepcidin učestvuje u maternalno-fetalnom transportu gvožđa kroz placentu (52). Mehanizam dejstva hepcidina je prikazan na Slici 10.



Slika 10. Mehanizam dejstva hepcidina (Adaptirano iz reference 68).

Hepcidin predstavlja senzitivni indikator deficita gvožđa, čak i u odsustvu anemije. Od otkrića hepcidina različite grupe istraživača su pokušale da razviju pouzdane testove za određivanje ovog peptida u biološkim tečnostima kako kod ljudi tako i kod eksperimentalnih životinja (84). Određene osobine hepcidina su ga učinile lošim kandidatom za tradicionalne imunohemijske metode bazirane na specifičnim anti-hepcidin antitelima. Mala molekula hepcidina ima četiri disulfidne veze između osam cisteinskih rezidua. To određuje prisustvo samo nekoliko antigenih epitopa, što zajedno sa visokim stepenom konzervacije sekvenci između vrsta čini poteškoće u izazivanju adekvatnog imunog odgovora u telu domaćina. Takođe, hepcidin ima tendenciju stvaranja agregata i prijanjanje za zidove plastičnih epruveta, što zahteva pažljivo rukovanje i standardizaciju preanalitičke procedure (57,95). Do danas je razvijeno nekoliko različitih metoda za određivanje vrednosti hepcidina u serumu i urinu. Prvi test se zasnivao na masenoj spektrometriji, ali nije našao primenu u rutinskoj kliničkoj praksi. Osim toga u primeni je RIA (Radio-immuno assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) i ligand vezujući test (97). Širok dijapazon vrednosti hepcidina je dobijen upotrebom ovih testova. Razlozi ovakvih diskrepanci nisu poznati, ali se kao mogući razlozi navode ukrštena reaktivnost sa metabolitima hepcidina, hepcidin vezujući faktori u serumu i nedostatak standardizacije testova. Danas je dostupno samo nekoliko komercijalnih kitova za određivanje hepcidina-25 u serumu. Ispitivanja koja su vršena u adultnoj populaciji pokazala su različite vrednosti hepcidina prema polu i starosti, međutim, rezultati nisu konzistentni. Takođe, mali broj studija u kojima je određivana vrednost hepcidina kod dece nije dao referentne vrednosti, niti korelaciju hepcidina sa polom, uzrastom, kao ni feremijom u različitim kliničkim stanjima (100). U opštoj populaciji, nivo hepcidina je značajno niži kod žena ispod 50 godina starosti u odnosu na muškarce iste starosne grupe, dok je nakon pedesete godine života sličan u oba pola i relativno konstantnih vrednosti tokom narednih decenija. Razlog tome su povećane potrebe za gvožđem kod žena tokom reproduktivnog perioda (89).

1.9.4 Mehanizam regulacije hepcidina

Sistemske faktori koji utiču na ekspresiju hepcidina su dobro proučeni, međutim, mehanizmi kojima je produkcija hepcidina regulisana na molekularnom nivou se još uvek ispituju (2).

1.9.4.1 Uticaj gvožđa na regulaciju hepcidina

Smatra se da na regulaciju hepcidina utiče i cirkulišuće i deponovano gvožđe putem glavnog signalnog puta koštanog morfogenog proteina (BMP, Bone morphogenic protein). BMP signalni put reguliše i mnoge druge procese, uključujući morfogenezu embriona, razvoj koštanog tkiva, remodelovanje i tkivnu reparaciju. U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima je dokazano da nekoliko BMP proteina (BMP 2,4,5,7,9) povećava produkciju hepcidina, ali se BMP6 smatra specifičnim endogenim regulatorom hepcidina (3). Produkuju ga sinusoidalne endotelijalne ćelije u jetri, vezuje se za BMP6 receptor u hepatocitima nakon čega se aktivira transkripcija hepcidina putem Smad1/5/8 signalnog puta (66,103). BMP6 je član porodice transformišućeg faktora rasta β (TGF- β , Transforming growth factor- β) (77,97). Kada su zalihe gvožđa popunjene, stvara se više BMP6, što dovodi do povišenih vrednosti hepcidina i prestanka dalje apsorpcije gvožđa u duodenumu. Kada su rezerve niske, BMP6 se ne stvara, nema produkcije hepcidina i gvožđe se slobodno apsorbuje. Hemojuvelin (HJV) glikoproteinu sličan membranski protein (GPI-linked membrane protein) predstavlja koreceptor u regulaciji gvožđa. Povećava senzitivnost BMP receptora za BMP6, zbog čega nastaje aktivni signalni kompleks HJV/BMP, što rezultira povećanom transkripcijom hepcidina. Mutacijom gena za HJV dolazi do prekomernog nakupljanja gvožđa. Molekuli kao što su transmembranska serinska proteaza matriptaza – 2 (TMPRSS6) i veliki multifunkcionalni transmembranski protein neogenin, stupaju u interakciju sa HJV i menjaju njegovu ekspresiju na ćelijskoj membrani, čime utiču na sintezu hepcidina (66).

Ustanovljeno je da BMP6–HJV–Smad signalizirajući put igra značajnu ulogu u regulaciji hepcidina i homeostazi gvožđa. Stimulacija koju izazivaju BMP6 i / ili gvožđe dovodi do povećanja u aktivnosti BMP6–HJV–Smad puta najverovatnije putem mehanizma u kom učestvuju protein humane hemohromatoze (HFE, Human hemochromatosis protein) i transferinski receptor 2 (TfR2), a što vodi do vezivanja Smad kompleksa za BMP – odgovarajućeg elementa na promotere hepcidina i do pojačane transkripcije gena za hepcidin. BMP receptor se sastoji od dve subjedinice, tip I i tip II. Aktivna kinaza fosforiliše tip II subjedinicu u tip I što dovodi do aktivacije Smad signalnog puta kroz fosforilaciju receptora grupe Smad (Smad1/5/8). Ovi receptori su povezani sa ko-Smad receptorom i formiraju heteromerni kompleks koji se prenosi u jedro i stimuliše ekspresiju širokog spektra ciljnih

gena uključujući i gene koji kodiraju hepcidin. BMP takođe može da sprovede i signal nezavisno od Smad puteva putem Map kinaze (2).

Regulacija ekspresije hepcidina putem cirkulišućeg gvožđa je preciznije opisana. Gvožđe vezano za transferin se vezuje za transferinski receptor 1 i 2 (TfR1 i TfR2) koji se nalaze na membrani, potom dolazi do endocitoze. Humani TfR2 je homolog TfR1, u 60% slučajeva su slični po primarnoj strukturi, ali je primarno mesto ekspresije TfR2 u jetri (66). Značajan je i HFE na kome najčešće postoji mutacija u slučaju nasledne hemohromatoze i ima značajnu ulogu u praćenju nivoa gvožđa i daljem usmeravanju hepcidinskog odgovora. Kada je nivo gvožđa nizak, HFE protein ulazi u interakciju sa TfR1 na mestu koje se ukršta sa vezivajućim mestom za transferin, međutim, kada koncentracija gvožđa vezanog za transferin poraste, ono se vezuje za TfR1 i istiskuje HFE. Na taj način HFE može da se veže za TfR2, gradeći kompleks HFE/TfR2 koji deluje kao promotor hepcidina, najverovatnije preko BMP signalnog puta. HFE je protein sličan molekulima klase I glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC, Major Histocompatibility Complex) (2,59,69,94).

1.9.4.2 Uticaj hipoksije na regulaciju hepcidina

Neke studije su pokazale da u slučaju hipoksije dolazi do smanjene ekspresije hepcidina. *In vivo*, hipoksija bi takođe mogla da izaziva indirektnu supresiju hepcidina posredstvom eritropoeze i pojačanim iskorišćavanjem gvožđa. Hipoksija indukovani faktor (HIF, Hypoxia-inducible factor) se smatra glavnim modulatorom metabolizma gvožđa i eritropoeze tokom hipoksije. HIF bi mogao da utiče na supresiju hepcidina indirektnim putem posredstvom razgradnje HJV. HIF je heterodimerni transkripcioni faktor koji se vezuje za elemente koji reaguju na hipoksiju (HREs, Hypoxia response elements), kontrolišući transkripciju gena. Sastoji se iz α (HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α) i β podjedinice (HIF-1 β). Dokazano je da HIF 1 α i 2 α povećavaju intestinalnu apsorpciju gvožđa, preuzimanje gvožđa od strane eritroidnih progenitornih ćelija, sintezu hema kao i supresiju stvaranja hepcidina i na taj način osiguravaju adekvatan priliv gvožđa za eritropoezu (2,59). Nivo HIF proteina je regulisan kiseonikom. U uslovima sa dovoljno kiseonika i gvožđa, HIF- α podjedinica je razgrađena. Kada je prisutna hipoksija i manjak gvožđa, dolazi do nakupljanja HIF- α podjedinice, njene translokacije u jedro, heterodimerizacije sa HIF-1 β i njihovog vezivanja za promotorni element osetljiv na hipoksiju na ciljnom genu, čiju transkripciju onda izaziva

(77,80,94). HIF deluje indirektno na smanjenje nivoa hepcidina jer se pod uticajem HIF-2 transkripcionog faktora stimuliše stvaranje EPO u bubrezima (80). Zapaženo je da davanjem injekcije EPO kod ljudi dolazi do značajnog pada vrednosti hepcidina unutar 24 sata, dok je kod miševa zabeleženo dozno-zavisno smanjenje hepcidina nakon administracije EPO (79). Faktor rasta i diferencijacije 15 (GDF 15, Growth Differentiation Factor 15) i izuvijani gastrulacioni protein 1 (TWSG 1, Twisted gastrulation protein 1), član superfamilije transformišućeg faktora rasta β , smatraju se potencijalnim faktorima koji suprimiraju produkciju hepcidina u anemijama sa neefektivnom eritropoezom što je zapaženo u β talasemiji i u kongenitalnoj diseritropoetskoj anemiji tip I. U studijama koje su sprovedene na miševima je dokazano da TWSG1 interferira sa BMP signalnim putem i na taj način utiče na regulaciju sinteze hepcidina (79,94). Hipoksija deluje na ekspresiju proteina furina, koji preko HJV deluje na BMP-Smad signalni put, što za posledicu ima smanjenje nivoa hepcidina. Takođe deluje i na stvaranje matriptaze -2, proteina koji zaustavlja transkripciju HAMP gena. Inhibitorskim uticajem na HFE, TfR-1, TfR-2 i HJV, hipoksija preko HIF utiče na smanjeno stvaranje hepcidina (80).

U HIGHCARE (HIGH altitude Cardiovascular Research Carried) studiji su ispitivani nivoi gvožđa, EPO, IL-6 i hepcidina u uslovima akutne i hronične izloženosti uslovima hipoksije. Zabeležen je pad nivoa hepcidina unutar 40 sati od nastanka akutne hipoksije na nadmorskoj visini od 3400m, dok je najniža vrednost zabeležena na nadmorskoj visini od 5400m, što je bilo praćeno sniženjem nivoa serumskog feritina. Snažna korelacija koja je dokazana u ovoj studiji između nivoa serumskog feritina i hepcidina govori u prilog tome da vrednosti gvožđa ili kinetika gvožđa u uslovima hipoksije mogu izazvati negativnu ekspresiju hepcidina (2).

Neefektivna eritropoeza je odgovorna za stanje hipoksije tokom anemije. EPO je glikoproteinski hormon koji se sintetiše u bubrezima i u toku hipoksije nivo serumskog EPO može biti sto puta viši nego u uslovima normalne koncentracije kiseonika. Pošto je hipoksija glavni regulator EPO, a samim tim i eritropoeze, smatra se da su snižene vrednosti hepcidina u anemiji posledica hipoksije, a ne eritropoeze same po sebi. Eritroferon, nedavno otkriveni hormon, koji se stvara u eritroblastima u odgovoru na EPO tokom procesa eritropoeze, odgovoran je za smanjenje ekspresije hepcidina (59).

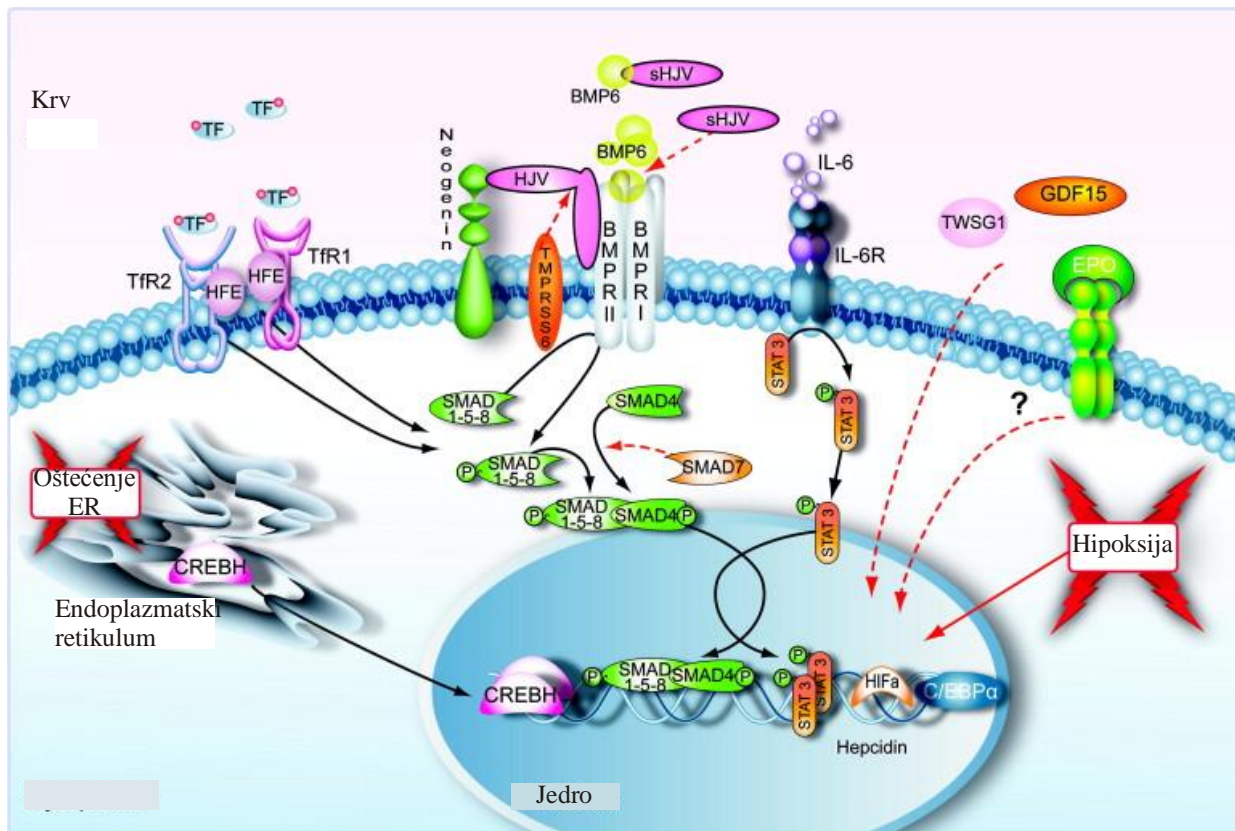
1.9.4.3 Uticaj inflamacije na regulaciju hepcidina

Sinteza hepcidina je značajno povećana u infekciji i inflamaciji, što dovodi do retencije gvožđa u makrofagima i smanjenja intestinalne apsorpcije gvožđa (104). Hipoferemija u toku infekcije je jedan od adaptivnih odgovora urođenog imunog sistema. Snižavanjem nivoa gvožđa, organizam sprečava proliferaciju patogenih mikroorganizama zavisnih od gvožđa (59). Iako postoji nekoliko proinflamatornih citokina za koje je dokazano da izazivaju pojačanu ekspresiju hepcidina, do sada je najviše proučavan uticaj IL-6 (2). IL-6 se na površini hepatocita vezuje za α subjedinicu svog receptora, nakon čega dolazi do dimerizacije β subjedinica i njihove fosforilacije pod dejstvom citosolnog proteina janus kinaze (JAK), što za posledicu ima aktivaciju STAT signalnog puta (STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription). STAT3 proteini se vezuju za β subjedinicu, od koje se nakon fosforilacije odvajaju i kao dimeri premeštaju u jedro, gde se vezuju za HAMP gen, povećavajući ekspresiju hepcidina. Takođe je opisano da regulacija ekspresije hepcidina može da se odvija i BMP/Smad signalnim putem (94).

Tokom inflamacije ćelije su izložene konstantno povišenim koncentracijama superoksida i vodonik peroksida. U ovakvim uslovima neophodna je precizna regulacija homeostaze gvožđa da bi se sprečilo oštećenje tkiva izazvano produktima Fentonove reakcije. U neutrofilima i makrofagima membranska nikotinamid adenin dinukleotid fosfat – oksidaza (NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) proizvodi superokside koji potom prelaze u vodonik peroksid posredstvom superoksid dismutaze (SOD, Superoxide dismutase). Zapaženo je da su veoma niske koncentracije vodonik peroksida dovoljne za vrlo moćnu regulaciju hepcidina u ćelijama hepatoma i primarnim hepatocitima kao i da vodonik peroksid sinergistički deluje sa drugim faktorima koji indukuju hepcidin kao što je IL-6. Efekti koje vodonik peroksid ima na hepcidin uglavnom su posredovani STAT3 putem koji je klasični inflamatorni put za regulaciju hepcidina (2).

Endoplazmatski retikulum bi mogao da ima značajnu ulogu u inflamaciji. Akutna inflamatorna reakcija dejstvom na endoplazmatski retikulum može da dovede do poremećaja homeostaze i akumulacije patoloških proteina unutar endoplazmatskog retikuluma, što bi moglo da se odrazi i na regulaciju hepcidina. Takođe, zapaženo je da hepcidin reaguje ne samo na ekstracelularne stimuluse, kao što su varijacije nivoa gvožđa i citokina, već i na

signale koje izaziva stres unutar ćelije. Među endogenim medijatorima ugljenmonoksid i azotmonoksid igraju značajnu ulogu u ovoj regulaciji (2,68). Regulacija ekspresije hepcidina je prikazana na Slici 11.



Slika 11. Regulacija ekspresije hepcidina (Adaptirano iz reference 80).

1.9.4.4 Uticaj ostalih činilaca na regulaciju hepcidina

Smatra se da u regulaciji hepcidina učestvuju i hepatocitni faktor rasta, epidermalni faktor rasta i steroidni hormoni (79).

Ikeda i saradnici su 2012. godine ukazali da estrogenu regulišu ekspresiju hepcidina preko G-udruženog proteina 30 (GPR30, G-coupled protein 30) – BMP6 zavisnog puta na osnovu čega estrogen snižava apsorpciju gvožđa u crevima. GPR30 se nalaze na ćelijskoj plazma membrani i endoplazmatskom retikulumu te posreduju u aktivnosti estrogena kao steroidni receptor. Noviji podaci sugerišu da estrogen direktno utiče na regulaciju hepatične ekspresije hepcidina (2).

Takođe, dokazano je da je vitamin D vrlo snažan regulator hepcidina kako u monocitima, tako i u hepatocitima. U uslovima nedostatka vitamina D povećano je stvaranje hepcidina u hepatocitima što može dovesti do povećanja koncentracije hepcidina unutar ćelija kao i sistemski, te na taj način posredno dovesti i do smanjene ekspresije FPN u ovim ćelijama. Direktna supresija transkripcije HAMP gena posredovana 1,25 dihidroksi vitaminom D koji se vezuje za receptor za vitamin D dovodi do snižavanja mRNA za hepcidin (2). U studiji koju su sprovedli *Bacchetta* i saradnici, suplementacija vitaminom D je za 34% smanjila koncentraciju serumskog hepcidina u ispitivanoj grupi (12).

Leptin koji se sintetiše u hepatocitima i strukturno je sličan IL-6, stimuliše sekreciju hepcidina kod gojaznih osoba (105,106).

1.9.5 Bolesti udružene sa poremećajem koncentracije hepcidina

1.9.5.1 Poremećaji zbog deficita ili rezistencije na hepcidin

Klinički poremećaji koji nastaju zbog deficita ili rezistencije na hepcidin su nasledna hemohromatoza i anemija sa prevelikim nakupljanjem gvožđa, odnosno neefektivnom hematopoezom (94).

1.9.5.1.1 Hereditarna hemohromatoza

Hereditarna hemohromatoza (HH) predstavlja grupu primarnih genetskih poremećaja homeostaze gvožđa u kojima povećana apsorpcija gvožđa iz hrane dovodi do njegove akumulacije u tkivima i oštećenja organa (3). HH tip I je daleko najčešća forma. Nastaje kao rezultat mutacije u HFE genu na hromozomu 6. Nasleđuje se autozomno recesivno (64,107). Karakteriše se postepenim deponovanjem gvožđa u organima i klinički se ispoljava najčešće kod muškaraca starosti 40-50 godina i kod žena u menopauzi (59). HH tip II, takođe poznata kao juvenilna hemohromatoza obuhvata podtip IIa koji nastaje zbog mutacije u HJV i podtip IIb koji nastaje zbog mutacije u HAMP genu. Početak bolesti je između 15 i 20 godina starosti (59,107). HH tip III nastaje zbog mutacije u TfR2 genu. Početak bolesti je između 30 i 40 godina starosti. HH tip IV se naziva i feroportinska bolest, rezultat je mutacije u SLC40A1 genu i nasleđuje se autozomno dominantno. Deli se na podtip IVa i V (59).

Kliničke manifestacije HH zavisi od mesta deponovanja gvožđa, a može se ispoljiti kao slabost, letargija, ataksija, oslabljena srčana funkcija, adrenalna insuficijencija, dijabetes,

ginekomastija, atrofija testisa, impotencija, abdominalni bol, ciroza jetre, hepatocelularni karcinom, artralgija, pigmentacija kože, opadanje kose (64).

1.9.5.1.2 Anemije sa prevelikim nakupljanjem gvožđa

U anemijama sa prevelikim nakupljanjem gvožđa, kao što su β -talasemija i kongenitalna diseritropoetična anemija, vrednosti hepcidina u serumu i urinu su značajno snižene (79). U β -talasemiji defektna sinteza β -globina u eritroidnim prekursorima dovodi do prekomernog stvaranja α -lanaca uzrokujući apoptozu prekursora eritrocita u kostnoj srži. To dovodi do produkcije EPO koji stimuliše stvaranja eritroidnih prekursora koji potom podležu apoptozi. Usled visokog nivoa EPO, nivo hepcidina je nizak, što za posledicu ima preveliku apsorpciju gvožđa u dvanaestopalačnom crevu i njegovo taloženje u tkivima i organima (3).

1.9.5.2 Poremećaji zbog visokih vrednosti hepcidina

U poremećaje koji nastaju zbog visokih vrednosti hepcidina spadaju anemija u inflamaciji, anemija sa smanjenim sadržajem i refrakternošću na gvožđe, anemija u hroničnoj bolesti bubrega i anemija u malignim bolestima (3).

1.9.5.2.1 Anemija u inflamaciji

Sinteza hepcidina je značajno povećana u inflamaciji, što dovodi do retencije gvožđa u makrofagima i smanjenja intestinalne apsorpcije gvožđa (104). U toku inflamacije povećana je sinteza proinflamatornog citokina IL-6, koji izaziva pojačanu ekspresiju hepcidina (2). Anemija se javlja kod obolelih od hroničnih infektivnih bolesti, reumatoloških bolesti i inflamatornih bolesti creva. Spada u blagu do umerenu normocitnu anemiju, mada može biti mikrocitna i hipohromna anemija, rezistentna na terapiju preparatima gvožđa. Karakteriše je povišena vrednost hepcidina, skraćen životni vek eritrocita zbog makrofagne aktivacije ili opsonizacije eritrocita, supresija eritropoeze zbog dejstva citokina na eritrocitne prekurzore ili zbog smanjenog stvaranja eritropoetina (3).

1.9.5.2.2 Anemija sa smanjenim sadržajem i refrakternošću na gvožđe

Predstavlja hereditarnu, hipohromnu, mikrocitnu anemiju refrakternu na oralnu terapiju preparatima gvožđa, sa delimičnim odgovorom na parenteralnu terapiju. Nastaje zbog povećane produkcije hepcidina usled mutacije u genu Tmprss6 na hromozomu 22, koji kontroliše membransku proteazu matriptazu-2, negativnog regulatora HJV. Mutacija u Tmprss6 genu je odgovorna za hroničnu hiperhepcidinemiju koja dovodi do sniženih vrednosti serumskog gvožđa. Retka forma anemije sa smanjenim sadržajem i refrakternošću na gvožđe je udružena sa hepatičnim adenomom (3,59,70).

1.9.5.2.3 Anemija u hroničnoj bolesti bubrega

Smatra se da su povišene vrednosti hepcidina kod obolelih od hronične bolesti bubrega posledica prevelike produkcije usled poremećenog metabolizma gvožđa i hronične inflamacije, kao i smanjenog izlučivanja zbog sniženog renalnog klirensa (94). Renalna ekskrecija je glavni put eliminacije hepcidina. Kada je funkcija bubrega očuvana, koncentracija urinarnog hepcidina dobro korelira sa koncentracijom serumskog hepcidina. U slučaju smanjenja bubrežne funkcije dolazi do akumulacije hepcidina u organizmu i razvoja gvožđe restriktivne anemije (3). Osim poremećaja nivoa hepcidina, kod osoba obolelih od hronične bolesti bubrega dolazi do smanjene sinteze EPO i rezistencije na terapiju EPO (52).

1.9.5.2.4 Anemija u malignim bolestima

Anemija u malignim bolestima može biti posledica same bolesti, ili nastaje kao rezultat hemoterapije i radioterapije (3). Tumorske ćelije dovode do pojave anemije infiltracijom kostne srži, destrukcijom eritroidnih progenitorskih ćelija stvaranjem slobodnih radikala ili produkcijom proinflamatornih citokina (52). U slučaju Hodgkinove bolesti i multiplog mijeloma anemija je praćena povišenim vrednostima hepcidina. Vrednosti hepcidina zavise od vrste, veličine i lokalizacije karcinoma kao i od inflamatornog odgovora domaćina na maligni proces (3).

1.9.6 Terapijski potencijal agonista i antagonista hepcidina

S obzirom da i povišene i snižene vrednosti hepcidina imaju značajnu ulogu u patogenezi različitih bolesti, smatra se da bi terapijska primena agonista i antagonista hepcidina dovela do poboljšanja zdravlja i kvaliteta života velikog broja pacijenata sa poremećajem metabolizma gvožđa (79,87).

1.9.6.1 Agonisti hepcidina

Jedinjenja koja imitiraju funkciju hepcidina ili potenciraju njegovu endogenu sintezu mogu prevenirati sistemsku akumulaciju gvožđa. Agonisti hepcidina predstavljaju terapijsku opciju u lečenju pacijenata sa lošim odgovorom na standardne načine lečenja, kao što je slučaj kod obolelih od hereditarne hemohromatoze i β -talasemije. Hecpidin sam po sebi ne poseduje dobre farmakološke osobine zbog poluvremena eliminacije od nekoliko minuta i komplikovanih disulfidnih veza. Osim toga, oralna apsorpcija hepcidina je nedovoljna zbog veličine od 2,7 kDa. Zbog toga se ulažu veliki napor u sintezi produkata koji imitiraju dejstvo hepcidina sa dobrim terapijskim mogućnostima (108).

Minihepcidini predstavljaju analoge hepcidina koji sadrže N-terminalni deo hepcidina sa 9 aminokiselina što je značajno za vezivanje za FPN. Dodavanjem neprirodnih aminokiselina povećana je rezistencija na proteolizu, dok je dodavanjem masnih kiselina produžen poluživot u cirkulaciji i povećana oralna apsorpcija. Minihepcidini se mogu primenjivati u cilju prevencije nakupljanja gvožđa u organizmu, ili u kombinaciji sa flebotomijom i helatorima gvožđa u lečenju poremećaja sa prekomernim nakupljanjem ovog metala (2,79,94).

Antagonisti matriptaze -2 i agonisti BMP6 predstavljaju potencijalne stimulatore proizvodnje hepcidina. Matriptaza -2 inhibiše sintezu hepcidina depresijom BMP/Smad signalnog puta koji predstavlja jedan od glavnih regulatornih mehanizama u kontroli ekspresije hepcidina. Druga mogućnost povećanja produkcije hepcidina podrazumeva primenu BMP6 ili njegovih agonista. Međutim kako ovaj signalni put ima ulogu i u morfogenezi kosti, ćelijskom rastu, diferencijaciji i apoptozi, angiogenezi i tumorima, potrebna su dodatna ispitivanja (2,79,94).

1.9.6.2 Antagonisti hepcidina

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na to da primena antagonista hepcidina može biti od koristi u lečenju anemije u inflamaciji, posebno kod pacijenata koji imaju autoimuno oboljenje, hronično oboljenje bubrega i neke tipove karcinoma (80,109).

Dejstvo hepcidina bi se moglo smanjiti smanjenjem njegove produkcije, direktnom neutralizacijom hepcidina ili blokiranjem vezivanja hepcidina za FPN (79).

S obzirom da je BMP/Smad signalni put najznačajniji za produkciju hepcidina, jasno je da će agensi koji interferiraju sa ovim putem dovesti do smanjenja produkcije hepcidina (79). Dozmorfin je mali molekul koji selektivno inhibiše receptore BMP tip 1 kao što su ALK2, ALK3 i ALK6 i na taj način blokira BMP posredovanu Smad 1/5/8 fosforilaciju. Solubilni HJV takođe deluje kao antagonista BMP puta. Tocilizumab, anti-IL-6 antitelo koji se primenjuje kod obolelih od reumatoidnog artritisa i Kastelmanove bolesti smanjuje ekspresiju hepcidina posredovanu IL-6. Antitela protiv faktora nekroze tumora α (TNF- α , Tumor necrosis factor - α) dovode do smanjenja nivoa hepcidina kod obolelih od reumatoidnog artritisa. Visoke doze EPO mogu suprimirati produkciju hepcidina. Takođe, heparin i derivati heparina inhibišu transkripciju hepcidina interferirajući sa BMP signalnim putem (80). Kod pacijenata kod kojih je primenjivan heparin u cilju prevencije duboke venske tromboze, serumska koncentracija hepcidina je smanjena za oko 80% nakon 2-5 dana od početka terapije. Međutim, njegova antikoagulantna aktivnost ograničava upotrebu u ovakve svrhe (79).

Antikalini su mali proteini dobijeni iz lipokalina, koji se vezuju za hepcidin i time neutrališu njegovu funkciju. Poseduju dobru tkivnu penetraciju i nisku imunogenost. Uključeni su u transport malih hidrofobnih molekula u ćeliju kao što su steroidi i lipidi. Do danas je opisan antikalin PRS-080 koji se vezuje za humani hepcidin i blokira interakciju između hepcidina i FPN (2). Spiegelmeri su derivati aptamera otporni na degradaciju nukleazama, stabilni su u cirkulaciji, imunološki neutralni i dobro se podnose. Prednost im je jer su visoko specifični za vezivanje za hepcidin. Nedostatak svih molekula koji se vezuju za hepcidin je velika molekulska masa koja bi mogla da utiče na prirodni put eliminacije hepcidina i time bi mogla doprineti daljem nakupljanju ovog molekula, kao i velika doza leka koja bi morala biti primenjena intravenski (79,94). Molekule kao što su fursultiamin, tioksolon i piriton cink preveniraju interakciju između hepcidina i FPN (2).

Međutim, nekoliko antagonista hepcidina uključujući dorzomorfin i njegove derivate, antagonisti IL-6 i spiegelmeri ispoljavaju štetne efekte, zbog čega je u poslednje vreme sve veći broj prirodnih produkata koji se koriste kao antagonisti hepcidina. Ekstrakt dobijen iz omotača semena crne soje inhibiše ekspresiju hepcidina *in vitro* i *in vivo*. Miricetin, flavonoid prisutan u orasima, luku, bobičastom voću, crvenom grejpfrutu, pored značajnih bioloških osobina kao što su antikancerozno, antiinflamatorno i antidijabetesno dejstvo, može uticati i na sistemsku homeostazu gvožđa. Ispitivanja na miševima su potvrdila da miricetin inhibiše ekspresiju hepcidina putem BMP/Smad signalnog puta, inhibišući Smad1/5/8 fosforilaciju. Nakon pet dana kontinuirane primene miricetina, hematološkim ispitivanjem zabeležene su povišene vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita. Sličan regulatorni mehanizam ima i kurkumin, biološki aktivan helator gvožđa koji smanjuje ekspresiju hepcidina čime utiče na sistemsku homeostazu gvožđa (109,110). Nove terapijske mogućnosti u lečenju poremećaja metabolizma gvožđa prokazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Nove terapijske mogućnosti u lečenju poremećaja metabolizma gvožđa (80).

Poremećaj	Nivo hepcidina	Trenutna terapija	Nove terapijske mogućnosti
Hereditarna hemohromatoza	Nizak	Flebotomija, helatori gvožđa	Agonisti hepcidina
Anemije sa prevelikim nakupljanjem gvožđa	Nizak	/	Agonisti hepcidina
Anemija u hroničnim bolestima	Visok	Preparati gvožđa, EPO, ESA	Antagonisti hepcidina
Anemija sa smanjenim sadržajem i refrakternošću na gvožđe	Visok	Gvožđe parenteralno	Antagonisti hepcidina
Adenom jetre	Visok	Operativno	Antagonisti hepcidina

1.9.7 Značaj hepcidina u dijagnostici anemije

Hepcidin ima najvažniju regulatornu ulogu u metabolizmu gvožđa što ga potencijalno čini korisnim biološkim markerom za dijagnozu i praćenje poremećaja metabolizma gvožđa (111). Koncentracija hemoglobina u fiziološkim granicama ne isključuje deficit gvožđa jer se nivo telesnog gvožđa značajno smanji pre nego vrednost hemoglobina padne ispod graničnih (*cut off*) vrednosti koja definiše anemiju (75). Snižene vrednosti serumskog hepcidina mogu se izmeriti pre nego dođe do pada vrednosti hemoglobina, hematokrita, eritrocitnih konstanti i feritina (111). Pouzdan je pokazatelj nivoa telesnog gvožđa i može upotpuniti najčešće korišćene parametre u proceni i diferencijalnoj dijagnostici anemija (53,102). Određivanje vrednosti hepcidina može predstavljati značajan skrining test među davaocima krvi što bi doprinelo smanjenju učestalosti anemija među ovom kategorijom stanovništva (53).

Za sada nema dovoljno podataka koji bi omogućili precizno definisanje referentnih vrednosti i potencijalnih graničnih (*cutt off*) vrednosti koje bi mogle biti pouzdan indikator nedostatka gvožđa (112). Utvrđeno je da koncentracija hepcidina pokazuje velike individualne razlike i da na vrednosti hepcidina utiču pol i uzrast, a moguće je da postoji i značajna razlika među populacijama (3,113). Referentne vrednosti za koncentraciju hepcidina u serumu i urinu nisu precizno definisane, tako da većina studija izveštava o rasponu izmerenih koncentracija, a pojedine studije pokušavaju da definišu potencijalne granične (*cut off*) vrednosti. Broj studija koje pokušavaju da definišu referentne vrednosti za hepcidin u dece je veoma mali, a rezultati su nehomogeni (100,114,115,116).

U našoj sredini do sada nisu rađena ovakva istraživanja. Nameće se potreba da se ispita kolika je koncentracija hepcidina u serumu u dece u našoj sredini za određenu metodu i test, da se utvrdi da li bi se ispitivani test mogao koristiti u dijagnozi sideropenijske anemije u dece, i da se, ukoliko je to moguće, odrede potencijalne granične (*cut off*) vrednosti.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi:

1. Odrediti serumske koncentracije hepcidina u dece uzrasta od 6 meseci do 2 godine i adolescenata uzrasta od 11 do 19 godina koji boluju od sideropenijske anemije i uporediti ih sa serumskim koncentracijama hepcidina u dece i adolescenata istog uzrasta koji ne boluju od sideropenijske anemije.
2. Odrediti povezanost koncentracije hepcidina sa koncentracijom gvožđa u serumu, koncentracijom feritina, nezasićenim kapacitetom vezivanja gvožđa, ukupnim kapacitetom za vezivanje gvožđa, koncentracijom transferina i procentom saturacije transferina.
3. Utvrditi senzitivnost i specifičnost hepcidina kao testa za otkrivanje sideropenijske anemije kod dece uzrasta od 6 meseci do 2 godine i adolescenata od 11 do 19 godina.

Hipoteze:

1. Koncentracija hepcidina je niža u dece i adolescenata koji boluju od sideropenijske anemije u poređenju sa decom i adolescentima koji ne boluju od sideropenijske anemije.
2. Koncentracija hepcidina je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom gvožđa u serumu, koncentracijom feritina, nezasićenim kapacitetom vezivanja gvožđa, koncentracijom transferina i procentom saturacije transferina, a u negativnoj sa ukupnim kapacitetom za vezivanje gvožđa.
3. Serumska koncentracija hepcidina je visoko senzitivna i specifičan pokazatelj deficita gvožđa kod dece i adolescenata koji boluju od sideropenijske anemije.

3. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Ispitivanje je sprovedeno kao prospektivno istraživanje u Institutu za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine u saradnji sa Centrom za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu. Odabir ispitanika i uzorkovanje materijala je sprovedeno tokom 2014. i 2015. godine.

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 173 ispitanika, 89 ispitanika koji su bolovali od sideropenijske anemije i 84 ispitanika koji nisu bolovali od sideropenijske anemije i koji su predstavljali kontrolnu grupu. Svi ispitanici su bili podeljeni u četiri grupe. Prvu grupu je činilo 56 ispitanika uzrasta od 6 meseci do 2 godine koji su bolovali od sideropenijske anemije (16 ispitanika je bilo ženskog pola, a 40 ispitanika muškog pola). Drugu grupu je činilo 33 adolescenta uzrasta od 11 do 19 godina koji su bolovali od sideropenijske anemije (26 ispitanika je bilo ženskog pola, a 7 ispitanika muškog pola). Treća i četvrta grupa su bile kontrolne sa 32 ispitanika uzrasta od 6 meseci do 2 godine, odnosno 52 adolescenta koji nisu bolovali od sideropenijske anemije.

U ispitivanu grupu su uključeni samo oni ispitanici koji su bolovali od sideropenijske anemije, koji su bili uzrasta od 6 meseci do 2 godine ili od 11 do 19 godina, koji nisu bolovali od drugih bolesti koje utiču na nivo hemoglobina i čiji je roditelj, odnosno staratelj potpisao ponuđeni Pristanak informisanog pacijenta/roditelja. U kontrolnu grupu su uključeni oni ispitanici koji nisu bolovali od sideropenijske anemije, koji su bili uzrasta od 6 meseci do 2 godine ili od 11 do 19 godina, koji nisu bolovali od drugih bolesti i čiji je roditelj, odnosno staratelj potpisao ponuđeni Pristanak informisanog pacijenta/roditelja. Iz ispitivanja su isključeni ispitanici koji su bili uzrasta ispod 6 meseci, odnosno između 2 i 11 godina i preko 19 godina, koji su bolovali od pridruženih bolesti koje utiču na nivo hemoglobina, kod kojih je započeta terapija sideropenijske anemije, koji su uzimali medikamente koji utiču na metabolizam gvožđa i čiji roditelj, odnosno staratelj nije potpisao ponuđeni Pristanak informisanog pacijenta/roditelja, kao i oni koji su naknadno povukli potpisani Pristanak informisanog pacijenta/roditelja i odbili da učestvuju u daljem istraživanju.

Tekst Pristanka informisanog pacijenta/roditelja je dat u prilogu.

Nakon obavljenog razgovora sa roditeljima svih ispitanika i ispitanicima uzrasta od 11 do 19 godina, pristupalo se prikupljanju uzoraka krvi za određivanje kompletne krvne slike,

broja retikulocita, koncentracije gvožđa u serumu, C-reaktivnog proteina, ukupnog kapaciteta za vezivanje gvožđa, nezasićenog kapaciteta vezivanja gvožđa, koncentracije feritina, koncentracije transferina, procenta saturacije transferina i koncentracije hepcidina.

Krv je dobijana venepunkcijom. Svi ispitivani parametri su određivani odmah nakon uzorkovanja krvi, jedino su u slučaju hepcidina uzorci nakon centrifugiranja zamrzavani na -70°C , do prikupljanja svih potrebnih uzoraka, nakon čega su laboratorijski analizirani.

Kompletna krvna slika je određivana kvantitativno metodom protočne citometrije na aparatu Celltac. Fiziološkim vrednostima eritrocita u uzrasnoj grupi 6-24 meseca su smatrane vrednosti $3,7-4,5 \times 10^{12}/\text{L}$, a u uzrasnoj grupi 11-19 godina $4,1-4,9 \times 10^{12}/\text{L}$. Fiziološkim vrednostima hemoglobina u uzrasnoj grupi 6-24 meseca smatrane su vrednosti 110-120g/L, u uzrasnoj grupi 11-19 godina kod ženskog pola 120-140g/L, a kod muškog pola 130-140g/L. Fiziološke vrednosti MCV u uzrasnoj grupi 6-24 meseca su $70-78 \times 10^{-15}/\text{L}$, u uzrasnoj grupi 11-19 godina $78-90 \times 10^{-15}/\text{L}$, MCH u uzrasnoj grupi 6-14 meseca $23-27 \times 10^{-12}/\text{L}$, u uzrasnoj grupi 11-19 godina $25-30 \times 10^{-12}/\text{L}$ i MCHC u obe uzrasne grupe 310-340 g/L. Normalan broj leukocita je $4-10 \times 10^9/\text{L}$, trombocita $140-400 \times 10^9/\text{L}$, a retikulocita 0,7-2,2%.

Određivanje serumske koncentracije C-reaktivnog proteina vršeno je imunoturbidimetrijski na aparatu Roche/Hitachi cobas c uz korišćenje komercijalnih setova firme Roche. Fiziološkim vrednostima C-reaktivnog proteina smatra se koncentracija 0-5 mg/L.

Gvožđe u serumu je određivano fotometrijski na aparatu Roche/Hitachi cobas c uz korišćenje komercijalnih setova firme Roche. Fiziološkim vrednostima gvožđa u uzrasnoj grupi 6-24 meseca su smatrane vrednosti 4-25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, a u uzrasnoj grupi 11-19 godina 5-33 $\mu\text{mol}/\text{L}$. TIBC je određivan fotometrijski na aparatu Roche/Hitachi cobas c uz korišćenje komercijalnih setova firme Roche. Fiziološkim vrednostima TIBC u uzrasnoj grupi 6-24 meseca smatra se 48-79 $\mu\text{mol}/\text{L}$, a u uzrasnoj grupi 11-19 godina 52-102 $\mu\text{mol}/\text{L}$. Tsat je izračunat prema formuli: $\text{serumsko Fe} \times 100 / \text{TIBC}$. Granična vrednost (*cut off*) vrednost za Tsat koja definiše sideropenijsku anemiju je <15%. Koncentracije feritina i transferin su određivane imunoturbidimetrijskom metodom na biohemijskom analizatoru Architect c800 komercijalnim setovima firme Abbott (Wiesbaden, Germany). Fiziološkim vrednostima koncentracije feritina za uzrasnu grupu 6-24 meseca su smatrane vrednosti 6-24 $\mu\text{g}/\text{L}$, a u uzrasnoj grupi 11-19 godina 6-40 $\mu\text{g}/\text{L}$. Fiziološkim vrednostima koncentracije transferina u

uzrasnoj grupi 6-24 meseca smatrane su vrednosti 2,18-3,47 g/L, a u uzrasnoj grupi 11-19 godina 2,33-4,44 g/L (117).

Svim ispitanicima je određivana koncentracija hepcidina u serumu. U tu svrhu korišćen je Quantikinine ELISA (Enzyme linked-immunosorbent assay) za kvantitativno određivanje humanog hepcidina, proizvođača R&D. Navedeni pribor (kit ili esej) je zasnovan na nekompetitivnoj, sendvič imunometrijskoj metodologiji. U prvom koraku hepcidin iz standardnih rastvora kao i seruma ispitanika se vezuje za monoklonska antitela koja oblažu zid čašica mikrotitarske ploče. Nakon prve inkubacije i ispiranja viška seruma, dodat je konjugat koji sadrži monoklonska antitela usmerena ka humanom hepcidinu, a vezan za enzim peroksidazu. Nakon druge inkubacije i ispiranja, u reakciju se dodaje supstrat solucija koja razvija bojenu reakciju određenog intenziteta, srazmernu koncentraciji humanog hepcidina u uzorcima. Trideset minuta od momenta dodavanja supstrata, reakcija se zaustavlja pipetiranjem određene zapremine stop solucije. Intenzitet boje se očitava kao optička gustina (optical density- OD), automatski na talasnoj dužini od 450 nm, sa korekcijom na 540 nm. Izradom standardne krive očitane su vrednosti hepcidina za sve ispitanike. Prema preporuci proizvođača, svi uzorci su diluirani u odnosu 1:5 i izvođeni u duplikatnim merenjima. Pri konačnoj interpretaciji koncentracija humanog hepcidina u serumu, vrednosti dobijene sa standardne krive su množene dilucionim faktorom, uzimanjem srednje vrednosti za svakog ispitanika. Proizvođač nije definisao i preporučio opseg referentnih vrednosti. Senzitivnost (osetljivost) analize je < 1,70 pg/mL. Preciznost analize je izražena kroz vrednosti koeficijenta varijacije (CV) i to za preciznost unutar jedne serije (intra-assay) vrednosti CV su redom: 4,3%, 3,1% i 3,2%; dok za preciznost između serija (inter-assay), CV su bili viši: 11%, 8% i 6,2%.

Za statističku obradu dobijenih podataka korišćene su hemometrijske analize, deskriptivna statistika, analiza glavnih komponenti, linearni model, veštačke neuronske mreže-ANN modeli (ANN, Artificial Neural Network). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička značajnost rezultata kao i vrednost regresionih koeficijenata u matematičkom modelu ispitivana je na statističkoj značajnosti: $p < 0,01$, $p < 0,05$ i $p < 0,10$.

3.1 HEMOMETRIJSKE ANALIZE

Naziv hemometrija je prvi put upotrebljen 1971. godine, a odnosi se na interdisciplinarnu naučnu oblast koja uključuje višeparametarsku statistiku, matematičko modelovanje, informatičke metode i analitičku hemiju. Primenom matematičkih, informatičkih i statističkih metoda, ostvaruje se efikasno i jednostavno određivanje fizičko-hemijskih osobina, predviđanje ponašanja ili klasifikovanje jedinjenja u neku od kategorija, na osnovu podataka o njihovoj molekulskoj strukturi (118,119).

Za uspostavljanje matematičke korelacije neophodno je sve informacije pretvoriti u numeričke vrednosti, a matematički obrazac se modeluje pomoću osnovnog skupa ulaznih podataka dobijenih eksperimentalnim putem.

Protetkih 30 godina, razvijene su različite hemometrijske metode, koje omogućavaju dobijanje pouzdanih modela za predviđanje nepoznatih vrednosti, reprodukciju poznatih eksperimentalnih podataka i klasifikaciju jedinjenja (120).

Neke od glavnih oblasti primene hemometrije uključuju (119).

1. Kalibraciju, validaciju i test značajnosti,
2. Optimizaciju hemijskih merenja i eksperimentalnih postupaka,
3. Pronalaženje maksimalne hemijske informacije na osnovu analitičkih podataka.

U okviru ove doktorske teze, od višeparametarskih matematičkih metoda primenjene su: deskriptivna statistika (Descriptive statistics), analiza glavnih komponenti (PCA, Principal components analysis), linearni model i veštačke neuronske mreže.

3.2 DESKRIPTIVNA STATISTIKA

Deskriptivna statistika je upotrebljena za kvantitativno opisivanje proučavanih osobina kako bi se opisali podaci i sagledali njihovi međusobni odnosi. Univarijantna analiza je urađena da bi se utvrdila raspodela promenljivih, uključujući centralnu tendenciju (srednje vrednosti) i disperziju (opsezi, standardne devijacije i varijanse).

Rezultati su interpretirani na osnovu Tukey-evog HSD testa, na nivou značajnosti $p < 0,05$, pri nivou poverenja od 95%. Tukey-ev HSD (Honestly significant distance) test pokazuje koliko treba da su udaljene bilo koje dve srednje vrednosti da bi bile statistički različite. Za razliku dve srednje vrednosti veću od standardne devijacije (SD), ovim testom se

dokazuje da je statistički značajna. Tukey-evim HSD testom podataka dobijenih različitim laboratorijskim merenjima, ustanovljeno je da je većina uzoraka statistički značajno različita na nivou $p < 0,05$, čime je dokazano da su ispitivani uzorci dovoljno raznoliki da bi se pristupilo statističkoj analizi i matematičkom modelovanju.

Deskriptivna statistička analiza, uz pomoć *Microsoft Excel 2007 softvera*, primenjena je za izračunavanje srednjih vrednosti, standardne devijacije i varijanse promenljivih.

3.3 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

Termin PCA-se odnosi na matematičku metodu za analizu podataka koja gradi linearne višeparametarske modele na osnovu kompleksnog seta podataka.

Linearni višeparametarski PCA modeli razvijaju se primenom ortogonalnih baznih vektora, koji se obično nazivaju glavne komponente (121).

PCA je višeparametarska matematička metoda u kojoj se ispituju korelacije između promenljivih, a na osnovu toga se broj promenljivih smanjuje i određuju se nove, faktorske koordinate. Ove transformacije (preslikavanja) koordinata izvode se tako da prva faktorska koordinata pokriva najveću moguću varijansu sistema, a analiza se koristi da se obezbedi najveće moguće razdvajanje između grupa (klastera) koje definišu promenljive. Ova metoda prepoznavanja sličnosti među grupama uzoraka se ovde koristi za karakterizaciju i razdvajanje uzoraka na osnovu uočenih osobina uzoraka (tj. na osnovu eksperimentalnih merenja svih promenljivih veličina koje se pripisuju određenom uzorku).

PCA omogućava značajno smanjivanje broja promenljivih, kao i detektovanje nekih strukturnih zavisnosti koje postoje između eksperimentalno merenih veličina i različitih uzoraka, što daje sveobuhvatniju sliku. "Auto - skaliranje" se vrlo često koristi za višeparametarsko poređenje različitih kompleksnih uzoraka hrane, pri čemu se uzorci ocenjuju (rangiraju) na osnovu srednje vrednosti i standardne devijacije grupe uzoraka. Pošto jedinice, kao ni skale različitih promenljivih koje opisuju poređene uzorke hrane nisu iste, potrebno je transformisati podatke svih merenja u tzv. standardne ocene, bezdimenzionalne vrednosti koje se dobijaju iz srednje vrednosti eksperimentalnih (merenih) vrednosti određene veličine za dati uzorak, podeljene sa standardnom devijacijom grupe uzoraka, prema jednačini 3.3.1.

$$\text{Standardna ocena} = (x - \mu)/\sigma \quad [3.3.1]$$

pri čemu je x mereni podatak, μ srednja vrednost grupe podataka, i σ standardna devijacija.

Celokupan skup podataka se uvodi u PCA analizu u obliku "auto-skalirane" matrice (122,123).

PCA ortogonalno transformiše eventualno korelisane podatke u skup linearno nekorelisanih promenljivih (glavne komponente). Faktorske koordinate nastaju linearnim transformacijama originalnih promenljivih, tako da prvih nekoliko osnovnih komponenti sadrže veći deo varijabilnosti originalnog seta podataka. Transformacija je definisana tako da prva glavna komponenta ima najveću moguću varijansu (odnosno najveću moguću varijabilnost podataka), a svaka naredna komponenta ima najveću moguću varijansu pod uslovom da bude ortogonalna (tj. u korelaciji) u odnosu na prethodne komponente.

Najjednostavnija vrsta PCA deli kovarijansne (odnosno korelacione) matrice na tzv. svojstvene vrednosti (engl. eigenvalues), obično posle centriranja srednjih vrednosti (i normalizacije) matrica za svaku promenljivu. Sopstvena vrednost meri količinu varijacije koja je opisana pomoću faktorskih koordinata, pri čemu najveći uticaj ima prva osnovna komponenta, a svaka sledeća manji. Sopstvena vrednost veća od 1 ukazuje da PCA uračunava više varijansi nego originalne promenljive, tako da se obično za tumačenje koriste samo te faktorske koordinate. Rezultati PCA analize se obično tumače na osnovu doprinosa (engl. score) promenljivih u komponentama. PCA je najzastupljenija multivarijaciona analiza koja otkriva međusobni odnos podataka na način koji najbolje objašnjava njihovu varijansu (124).

PCA i korelaciona analiza su urađene primenom *StatSoft Statistica 10* programa.

3.4 LINEARNI MODEL

Polinom se pokazao kao odgovarajući oblik odzivne funkcije, s obzirom da se kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. U većini slučajeva se koriste polinomi prvog ili drugog stepena. Modeli dobijeni na ovakav način su posebno pogodni za rešavanje optimizacionih problema, jer opisuju interakcije velikog broja faktora, a i procena kvaliteta fitovanja polinomskih modela se može lako odrediti (123,124). Nemogućnost predviđanja vrednosti odziva izvan ispitivanog opsega procesnih parametara je glavni nedostatak primene polinomskih modela.

Najjednostavniji polinom koji se može primeniti je polinom prvog reda koji u obzir uzima samo linearne uticaje pojedinačnih faktora (3.4.1):

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad [3.4.1]$$

Osnovna prednost polinomnih modela je u tome što je potreban manji broj merenih podataka da bi se obezbedio dovoljan broj informacija za određivanje statistički validnih rezultata. Ove jednačine opisuju parametre sistema i njihov uticaj na posmatrane odzive sistema, određuju međuzavisnosti testiranih promenljivih i ispituju kombinovane efekte parametara procesa na posmatrane odzive, omogućavajući da se na efikasan način istraži uticaj promenljivih na pokazatelj stanja anemije pacijenta.

Statistička značajnost rezultata kao i vrednost regresionih koeficijenata u matematičkom modelu ispitivana je na statističkoj značajnosti: $p < 0,01$, $p < 0,05$ i $p < 0,10$.

3.5 VEŠTAČKE NEURONSKE MREŽE-ANN MODELI

Neuronske mreže su sistemi sačinjeni od više jednostavnih elemenata (neurona) koji istovremeno obrađuju podatke. Funkcije koje su ANN u stanju da obrađuju zavise od strukture mreže, a obrada podataka se izvodi u „neuronima”. Veštačke mreže “uče” iz setova podataka na osnovu kojih se formira algoritam metodom proba-greška, pri čemu se podešavaju propusni (tzv. težinski) koeficijenti između neurona. Obučavanje neuronskih mreža se svodi na učenje iz primera kojih bi trebalo da bude što više kako bi ANN bila preciznija. Podaci iz skupa za učenje se periodično propuštaju kroz mreže, a kasnije se dobijene vrednosti upoređuju sa očekivanim i poboljšavaju menjanjem težinskih koeficijenata.

Pri razvijanju ANN modela se, prema preporuci iz programa StatSoft Statistica, baza podataka merenih vrednosti nasumično deli (randomize funkcijom) na podatke za učenje (60%), proveru (20%) i testiranje neuronske mreže (20%). Deo podataka koji služe za proveru koristi se za testiranje performanse mreže u toku procesa učenja kao indikatora nivoa generalizacije i momenta kada je taj proces završen. Podaci za testiranje služe za ispitivanje sposobnosti generalizacije mreže.

Zbog zahteva algoritma koji se koristi u proračunu ANN, ulazni i izlazni podaci se uobičajeno normalizuju korišćenjem jednačine [3.5.1] u kojoj je q_i i -ti član koji predstavlja izmerene vrednosti Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc i Tsat:

$$q_{i\text{ nom.}} = \frac{q_i - \min(q_i)}{\max(q_i) - \min(q_i)} \quad [3.5.1]$$

Normalizovane promenljive imaju vrednosti između 0 i 1, i nemaju nikakvo fizičko značenje. Svrha ovih transformacija je promena raspodele ulaznih promenljivih, kako bi se bolje uklopila u raspodelu predviđenih izlaza. Na ovaj način se ubrzava faza učenja mreže (125).

Neuroni u mreži su organizovani u dva ili više slojeva, gde je prvi sloj ulazni, poslednji izlazni, a unutrašnji skriveni sloj (Slika 3.5.1). Radi razvijanja adekvatne ANN neophodno je izabrati broj skrivenih slojeva i broj neurona u njima. Više skrivenih slojeva može dovesti do problema lokalnih minimuma i sporije konvergencije u toku faze učenja mreže, daleko je povoljnija primena samo jednog sloja. Organizacija slojeva i način njihovog povezivanja specifična je za svaki zadatak (126,127).

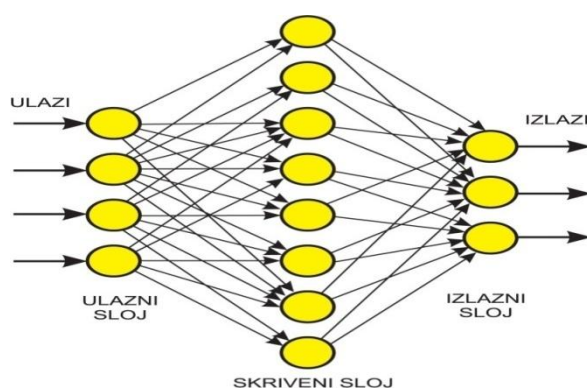
U okviru ove doktorske disertacije primenjeni su višeslojni perceptron modeli (MLP, Multi-Layer Perceptron) koji se sastoje od ukupno tri sloja (ulaznog, skrivenog i izlaznog), a predstavljaju najuobičajeniju i najfleksibilniju mrežu. Istraživanja su pokazala da su ovi modeli pogodni za aproksimiranje nelinearnih zavisnosti (128,129,130). Informacija se prenosi između slojeva uz pomoć prenosnih i aktivacionih funkcija, koje su uobičajeno linearne za ulazne i izlazne slojeve, a nelinearne u skrivenom sloju. Najčešće nelinearne aktivacione funkcije koje se koriste pri računanju ANN u StatSoft Statistica programu su: logaritamske, sigmoidalne, hiperboličke i tangentne funkcije (takođe i eksponencijalne, sinusne, softmax, Gausove). U većini primena, hiperboličke tangentne funkcije se ponašaju bolje od ostalih (128).

MLP neuronske mreže „uče“ primenom povratnog prostiranja (*backpropagation*), pri čemu se rešavanje skupa nelinearnih jednačina ostvaruje upotrebom *Levenberg–Marquardt* algoritma. Ova topologija ANN je jedna od najčešće korišćenih i proučavanih za različite primene.

Srednja kvadratna greška u izračunatoj vrednosti nekog izlaza se šalje unazad kroz sistem neurona, pri čemu dolazi do proporcionalnih promena vrednosti težinskih koeficijenata (*weights*) i netačnosti računanja (*biases*), koje se povećavaju ili smanjuju, u zavisnosti od pravca greške u predviđanju izlaza u odnosu na eksperimentalnu vrednost, sa ciljem njenog minimiziranja. Kada su ove vrednosti izmenjene, ulazni podatak vezan za drugi uzorak ulazi u sistem i proces se ponavlja.

Cilj je da se obradi što veći broj uzoraka u fazi učenja, kako bi se obezbedio najviši kvalitet izlaznih veličina u odnosu na ulazne, kada je model razvijen sa najnižim vrednostima SOS, čime se postiže optimizacija (125,128,129,130,131,132,133,134).

Da bi se izbegla prekomerna specijalizacija modela, primenjuje se postupak ranog zaustavljanja učenja mreže, koji je inkorporiran u postupak učenja, u trenutku kada se dobiju najmanje vrednosti SOS (Sum of Squares). Ovako dobijeni modeli tipično imaju veliku prediktivnu tačnost na skupu primera za učenje, a značajno nižu na novim, nepoznatim primerima podataka, ili testnom skupu podataka (135).



Slika 3.5.1 Šematski prikaz neuronske mreže sa tri sloja (Adaptirano iz reference 127).

Prvobitna procena potrebnog broja neurona dobija se na osnovu jednačine 3.5.2 u kojoj x i y predstavljaju broj ulaznih i izlaznih neurona respektivno, dok je n broj neurona u skrivenom sloju, a m broj težinskih koeficijenata odnosno veza između slojeva u neuronskoj mreži:

$$m = n \cdot (x + 1) + y \cdot (n + 1) \quad [3.5.2]$$

m se okvirno može smatrati brojem uzoraka korišćenih za učenje mreže podeljenim sa 10. Preporuke su da broj skrivenih neurona bude između broja ulaza i izlaza, ili 2/3 veličine ulaznog sloja plus veličina izlaznog sloja, ili manje od duplog broja ulaznih podataka (136). Utvrđivanje odgovarajućeg broja skrivenih slojeva i neurona je jedan od najvažnijih zadataka pri dizajniranju ANN. Ovi brojevi zavise od kompleksnosti veza između ulaza i izlaza (128).

Osim vrednosti SOS, kao parametar za proveru performanse mreža upotrebljen je korelacioni koeficijent, r . Nakon odabira najbolje mreže, model se može implementirati korišćenjem algebarskog sistema jednačina radi predviđanja stanja pacijenta (anemičan ili ne)

na osnovu poznatih vrednosti merenih veličina Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc i Tsat, zamenom odgovarajućih težinskih koeficijenata i koeficijenata u matricama u jednačini [3.5.3]. Proračune je moguće izvesti u *Microsoft Office Excel*-u. Težinski koeficijenti vezani za skriveni sloj, kao i računске greške odnosno ostaci pri računanju, su grupisani u matricama W_1 i B_1 . Slično tome, koeficijenti koji se odnose na izlazni sloj su grupisani u matricama W_2 i B_2 . Ako je Y matriks izlaznih promenljivih, f_1 i f_2 prenosne funkcije u skrivenom i izlaznom sloju respektivno, a X matriks ulaznih promenljivih, ANN se može predstaviti na sledeći način (135).

$$Y = f_1(W_2 \cdot f_2(W_1 \cdot X + B_1) + B_2) \quad [3.5.3]$$

Težinski koeficijenti prenosnih funkcija neurona u matricama W_1 i W_2 se određuju tokom obučavanja mreže korišćenjem optimizacije radi minimizovanja grešaka između izlaza predviđenih mrežom i eksperimentalnih podataka (136). Greške se računaju na osnovu SOS i BFGS (*Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno*) algoritma, da bi se konvergencija ubrzala i stabilizovala (137).

ANN predstavljaju univerzalne modele koji mogu da koriste bilo koje linearne ili nelinearne funkcije. Zbog fleksibilnosti u aproksimaciji funkcija, to su moćne metode u zadacima koji uključuju klasifikaciju modela, procenu i predviđanje kontinualnih promenljivih. Međutim, glavni nedostatak ANN je teškoća u interpretaciji stečenog znanja na osnovu modela. Ukratko, ANN model funkcioniše kao „crna kutija“, odnosno ne govori o tome kako su dobijeni izlazi u modelu niti na koji način ulazi utiču na izlaze (138). Pošto verodostojnost nekog modela često zavisi od mogućnosti da se objasne zaključci do kojih se dolazi, neophodno je sprovesti i ovakvu analizu (125,139). *Sensitivity* analiza se sprovodi radi proučavanja uticaja posmatranih ulaznih promenljivih, nesigurnosti dobijenih modela i opšteg ponašanja ANN (128,140).

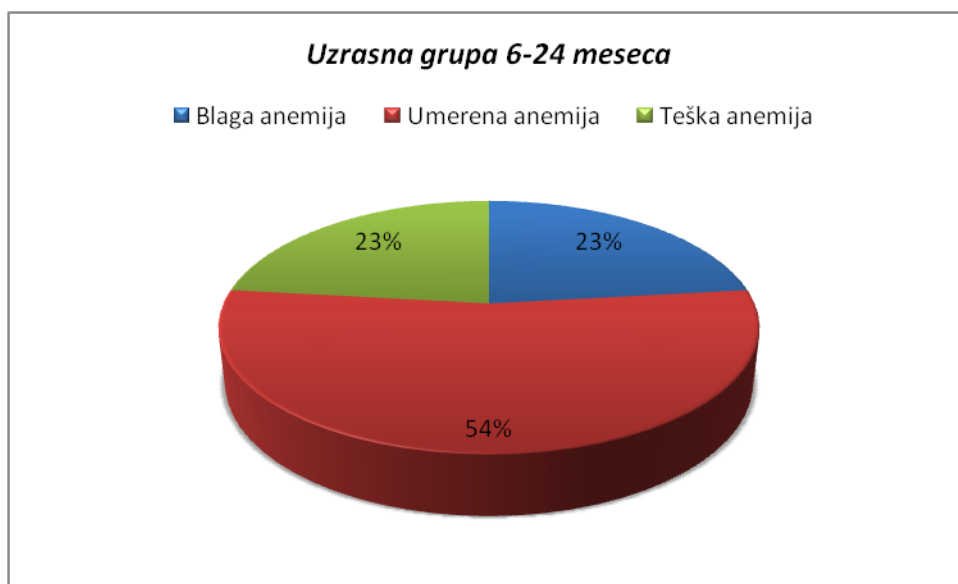
Sensitivity analiza se koristi da se utvrdi koliko su modeli „osetljivi“ na promene vrednosti parametara modela i na promene u strukturi modela. Ova analiza predstavlja jednostavan i moćan alat za procenu ponašanja sistema, te ima široku primenu u nauci i inženjerstvu. Velika osetljivost na malu promenu nekog parametra sugerise da će se izlaz drastično promeniti (125).

Dobijeni modeli su testirani *sensitivity* analizom da bi se utvrdilo da li će i pod kojim uslovima doći do grešaka u predviđanju izlaznih promenljivih, kao i da bi se utvrdio uticaj ulaznih promenljivih na posmatrane izlaze.

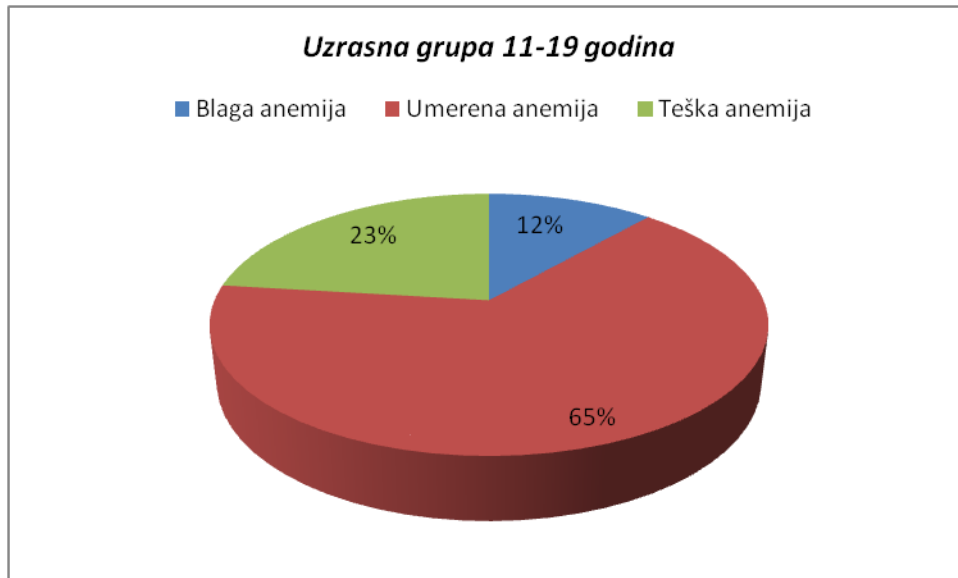
4. REZULTATI

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 173 ispitanika, 89 ispitanika koji su bolovali od sideropenijske anemije i 84 ispitanika koji nisu bolovali od sideropenijske anemije i koji su predstavljali kontrolnu grupu. Svi ispitanici su bili podeljeni u četiri grupe. Prvu grupu je činilo 56 ispitanika uzrasta od 6 meseci do 2 godine koji su bolovali od sideropenijske anemije (16 ispitanika je bilo ženskog pola, a 40 ispitanika muškog pola). Drugu grupu je činilo 33 adolescenta uzrasta od 11 do 19 godina koji su bolovali od sideropenijske anemije (26 ispitanika je bilo ženskog pola, a 7 ispitanika muškog pola). Treća i četvrta grupa su bile kontrolne sa 32 ispitanika uzrasta od 6 meseci do 2 godine, odnosno 52 adolescenta koji nisu bolovali od sideropenijske anemije.

Ispitivanjem stepena težine anemije utvrđeno je da je u uzrasnoj grupi 6-24 meseca 23,21% (13) dece imalo blagu anemiju, 53,57% (30) umerenu i 23,21% (13) dece tešku anemiju. U uzrasnoj grupi 11-19 godina 11,5% (26) adolescentkinja je imalo blagu anemiju, 65,38% (17) umerenu i 23,07% (6) tešku anemiju. U našem ispitivanju 4 ispitanika muškog pola je imalo blagu, a 3 umerenu anemiju.



Grafikon 4.1. Stepen težine anemije u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca.



Grafikon 4.2. Stepen težine anemije u uzrasnoj grupi od 11 do 19 godina.

4.1 REZULTATI BIOHEMIJSKIH ANALIZA

Tabela 4.1.1. (a) Deskriptivna statistika promenljive za anemične i zdrave ispitanike za uzrast od 6 do 24 meseca i od 11 do 19 godina.

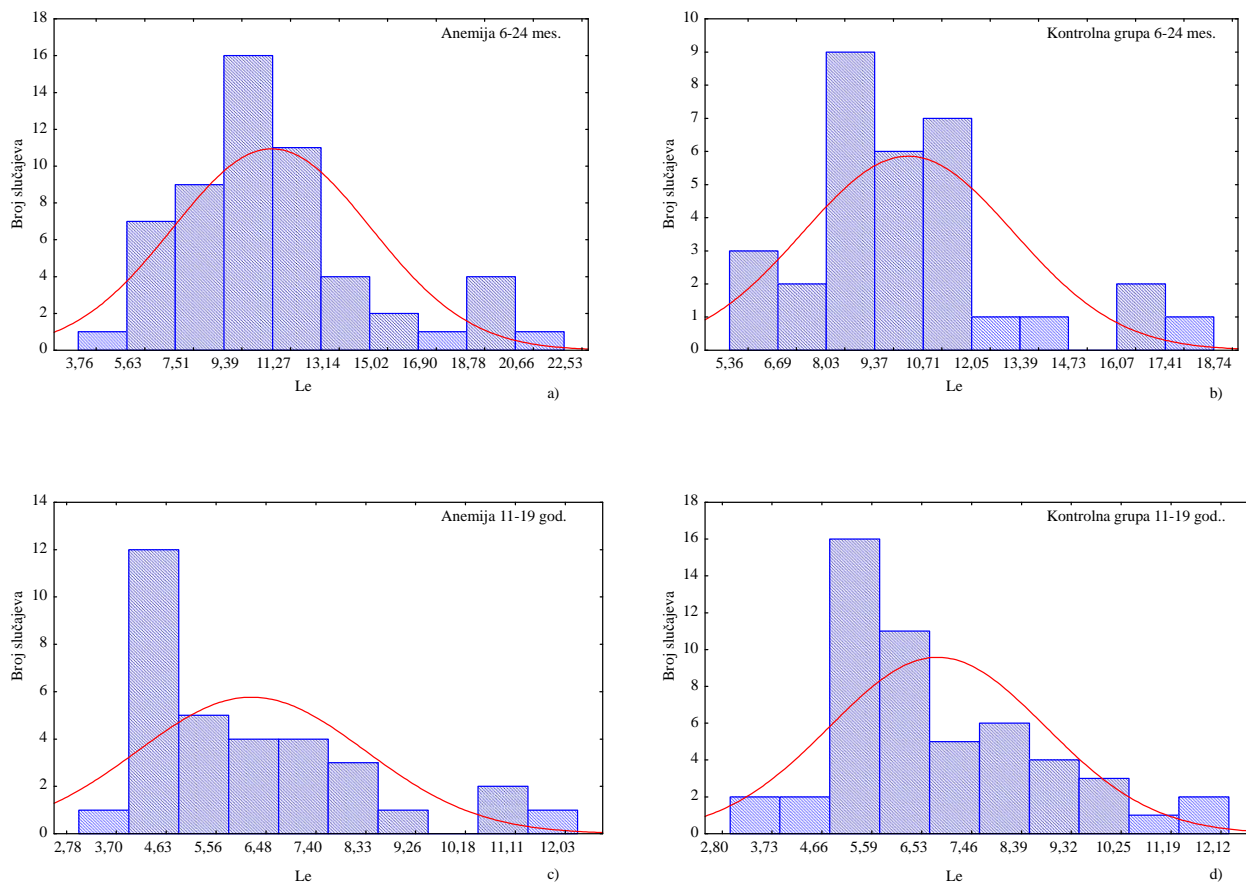
Zbirno	diag	Uzrast	Broj	Sr. vred.±SD	Min	Max	Var	Median
Le	Anem.	11-19 god.	33	6,211±2,113 ^a	4,000	20,900	14,699	10,060
	Kontrola	11-19 god.	52	6,822±2,019 ^a	5,510	17,560	8,522	9,450
	Anem.	6-24 mes.	56	10,547±3,834 ^b	3,470	11,800	4,466	5,600
	Kontrola	6-24 mes.	32	9,785±2,919 ^b	3,410	11,800	4,075	6,385
Er	Anem.	11-19 god.	33	4,474±0,592 ^a	2,550	6,110	0,440	4,690
	Kontrola	11-19 god.	52	4,689±0,465 ^a	3,850	5,700	0,245	4,720
	Anem.	6-24 mes.	56	4,602±0,663 ^a	2,720	5,640	0,351	4,490
	Kontrola	6-24 mes.	32	4,746±0,495 ^a	3,850	5,760	0,216	4,680
Hb	Anem.	11-19 god.	33	96,364±16,524 ^b	50,000	109,000	236,372	84,000
	Kontrola	11-19 god.	52	136,481±11,055 ^d	107,000	126,000	30,968	115,500
	Anem.	6-24 mes.	56	83,982±15,409 ^a	60,000	128,000	289,729	96,000
	Kontrola	6-24 mes.	32	115,750±5,565 ^c	118,000	160,000	122,215	136,000
Tr	Anem.	11-19 god.	33	292,485±79,399 ^a	171,000	1,1E+03	3,5E+04	3,9E+02
	Kontrola	11-19 god.	52	217,231±53,427 ^b	222,000	6,1E+02	1,1E+04	3,2E+02
	Anem.	6-24 mes.	56	426,357±186,214 ^c	168,000	5,0E+02	6,3E+03	2,8E+02
	Kontrola	6-24 mes.	32	345,500±105,856 ^a	94,000	3,8E+02	2,9E+03	2,0E+02
MCV	Anem.	11-19 god.	33	69,582±9,705 ^a	44,100	83,000	82,195	58,450
	Kontrola	11-19 god.	52	83,588±5,264 ^c	61,400	84,500	42,465	74,600
	Anem.	6-24 mes.	56	60,420±9,066 ^b	47,800	83,700	94,187	74,900
	Kontrola	6-24 mes.	32	72,919±6,517 ^a	71,400	99,400	27,707	84,100
MCH	Anem.	11-19 god.	33	20,958±3,693 ^b	12,200	33,000	16,017	16,950
	Kontrola	11-19 god.	52	29,385±2,196 ^d	19,900	30,100	6,946	24,200
	Anem.	6-24 mes.	56	17,961±4,002 ^a	15,700	28,600	13,641	19,800
	Kontrola	6-24 mes.	32	24,381±2,636 ^c	23,900	36,600	4,822	29,250
MCHC	Anem.	11-19 god.	33	313,030±25,618 ^a	248,000	398,000	874,316	292,500
	Kontrola	11-19 god.	52	349,731±28,398 ^b	302,000	472,000	1110,064	331,500
	Anem.	6-24 mes.	56	296,107±29,569 ^a	264,000	377,000	656,280	311,000
	Kontrola	6-24 mes.	32	336,531±33,318 ^b	209,000	440,000	806,436	350,000

Različita slova (a-d) u eksponentu u tabelama 4.1.1 a i b ukazuju na statistički značajnu razliku srednjih vrednosti između dobijenih vrednosti promenljivih za dve različite populacije i dve starosne grupe, pri nivou značajnosti $p < 0,05$ (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Trans - transferin; Tsat - procenat saturacije transferina, Sr. vred. - srednja vrednost, SD - standardna devijacija, Min - minimum, Max - maksimum, Var - varijansa, Median – medijana.

Tabela 4.1.1. (b) Deskriptivna statistika promenljive za anemične i zdrave ispitanike za uzrast od 6 do 24 meseca i od 11 do 19 godina

Zbirno	diag	Uzrast	Broj	Sr. vred.±SD	Min	Max	Var	Median
Fe	Anem.	11-19 god.	33	6,215±4,345 ^a	1,850	15,700	10,555	3,430
	Kontrola	11-19 god.	52	14,186±5,703 ^b	4,400	23,400	22,717	9,150
	Anem.	6-24 mes.	56	4,751±3,249 ^a	1,900	20,000	18,876	4,800
	Kontrola	6-24 mes.	32	10,736±4,766 ^c	5,400	31,900	32,527	12,400
UIBC	Anem.	11-19 god.	33	68,639±12,910 ^a	30,100	97,500	308,602	73,700
	Kontrola	11-19 god.	52	48,344±11,406 ^b	39,900	82,500	95,380	52,500
	Anem.	6-24 mes.	56	70,887±17,567 ^a	36,800	92,900	166,658	72,200
	Kontrola	6-24 mes.	32	56,334±9,766 ^c	21,100	78,700	130,095	49,400
TIBC	Anem.	11-19 god.	33	75,294±10,605 ^{ab}	45,200	100,650	192,419	81,700
	Kontrola	11-19 god.	52	62,652±9,290 ^c	53,000	90,400	76,925	68,950
	Anem.	6-24 mes.	56	78,057±13,872 ^b	45,200	94,900	112,475	76,900
	Kontrola	6-24 mes.	32	69,254±8,771 ^a	42,300	88,900	86,299	62,050
CRP	Anem.	11-19 god.	33	0,049±0,202 ^a	0,000	55,000	54,983	0,000
	Kontrola	11-19 god.	52	0,003±0,024 ^a	0,000	3,530	0,477	0,000
	Anem.	6-24 mes.	56	1,291±7,415 ^a	0,000	1,100	0,041	0,000
	Kontrola	6-24 mes.	32	0,181±0,690 ^a	0,000	0,170	0,001	0,000
Feritin	Anem.	11-19 god.	33	10,139±5,162 ^a	0,700	60,700	66,450	12,500
	Kontrola	11-19 god.	52	20,429±6,721 ^b	9,000	52,100	128,279	15,500
	Anem.	6-24 mes.	56	13,502±8,152 ^a	0,100	27,300	26,648	9,300
	Kontrola	6-24 mes.	32	19,859±11,326 ^b	8,000	40,300	45,169	18,750
Trans	Anem.	11-19 god.	33	3,506±0,343 ^a	2,540	4,410	0,202	3,760
	Kontrola	11-19 god.	52	2,740±0,245 ^b	2,320	4,140	0,135	2,940
	Anem.	6-24 mes.	56	3,656±0,450 ^a	2,600	4,100	0,118	3,500
	Kontrola	6-24 mes.	32	3,007±0,368 ^c	2,400	3,400	0,060	2,700
Hepcidin	Anem.	11-19 god.	33	4,1±18 ^a	0,050	13	9,9E+03	4,7
	Kontrola	11-19 god.	52	10±7 ^b	0,078	130	6,0E+05	5,1
	Anem.	6-24 mes.	56	4,4±3,1 ^a	0,050	5,6	3,3E+03	4,7
	Kontrola	6-24 mes.	32	14±24 ^b	0,078	90	2,7E+05	5,5
Rtc	Anem.	11-19 god.	33	1,770±0,606 ^b	0,059	4,200	0,497	1,800
	Kontrola	11-19 god.	52	1,152±0,410 ^a	0,600	1,700	0,072	1,250
	Anem.	6-24 mes.	54	1,929±0,705 ^b	0,015	3,200	0,367	1,700
	Kontrola	6-24 mes.	30	1,317±0,268 ^a	0,011	1,600	0,168	1,200
Tsat	Anem.	11-19 god.	33	8,791±7,320 ^a	2,200	30,700	44,164	3,950
	Kontrola	11-19 god.	52	23,404±11,010 ^c	6,000	36,900	52,343	13,775
	Anem.	6-24 mes.	56	6,998±6,646 ^a	2,100	32,400	53,577	5,600
	Kontrola	6-24 mes.	32	15,583±7,235 ^b	8,460	56,400	121,215	20,310



Grafikon 4.1.1. Raspodela vrednosti parametra Le za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi od 11-19 godina.

Parametar Le za ispitanike koji boluju od anemije, za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $6,211 \times 10^9/L$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $6,822 \times 10^9/L$. Između ove dve vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu od 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od sideropenijske anemije ima srednju vrednost Le $10,547 \times 10^9/L$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Le od $9,785 \times 10^9/L$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (a) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Le za posmatrane dve uzrasne grupe.

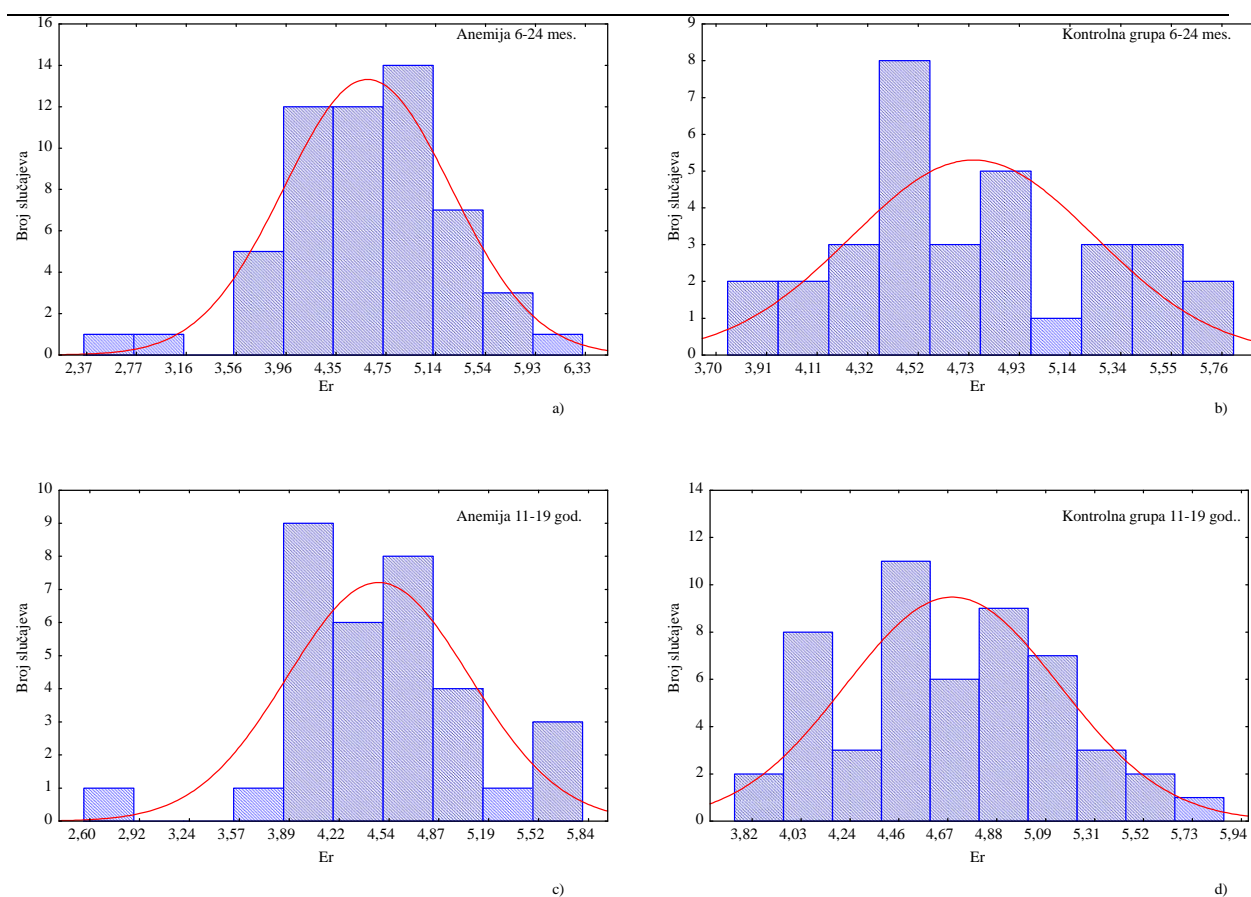
Na grafikonu 4.1.1. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Le kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da

postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.2. se vidi da faktor uzrasta grupe najviše utiče na vrednost parametara Le, statistički značajno na nivou $p < 0,01$. Takođe se vidi da nelinearni član uzrast \times anemija ima izvestan uticaj, statistički značajno na nivou $p < 0,10$.

Tabela 4.1.2. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Le.

	dF	Le SS	Le F	Le p
Nulti član	1	10842,98	1301,79	0,00
Uzrast	1	495,75	59,52	0,00
anem	1	2,17	0,26	0,61
Uzrast \times anem	1	28,22	3,39	0,07
Greška	165	1374,33		



Grafikon 4.1.2. Raspodela vrednosti parametra Er za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

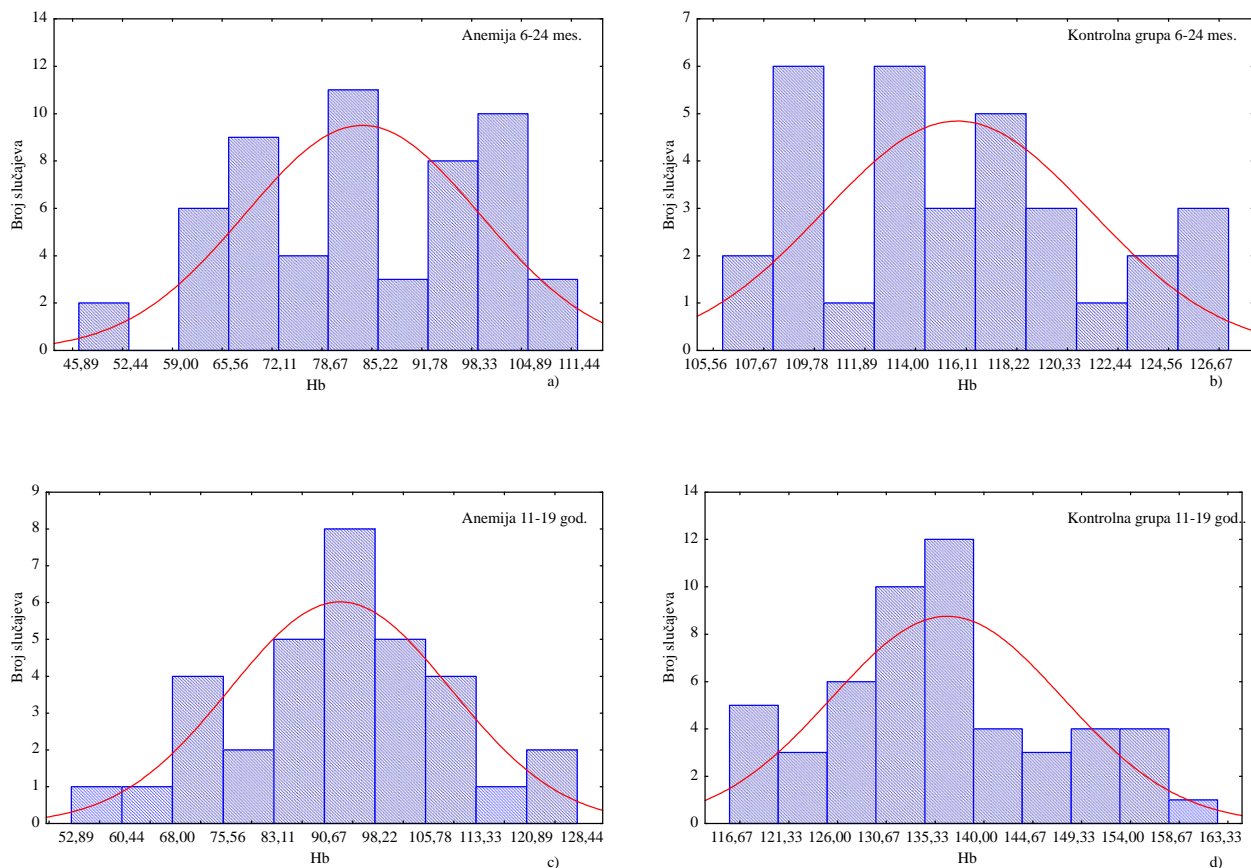
Parametar Er za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $4,474 \times 10^{12}/L$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $4,689 \times 10^{12}/L$. Između ove dve vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Er $4,602 \times 10^{12}/L$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Er od $4,746 \times 10^{12}/L$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (a) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Er za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.2. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Er kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-ovom HSD testu.

Iz tabele 4.1.3. se vidi da faktor anemija grupe najviše utiče na vrednost parametara Er, statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Tabela 4.1.3. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Er.

	dF	Er SS	Er F	Er p
Nulti član	1	3369,22	10921,82	0,00
Uzrast	1	0,24	0,77	0,38
anem	1	1,49	4,84	0,03
Uzrast × anem	1	0,02	0,05	0,82
Greška	165	50,90		



Grafikon 4.1.3. Raspodela vrednosti parametra Hb za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi od 11-19 godina.

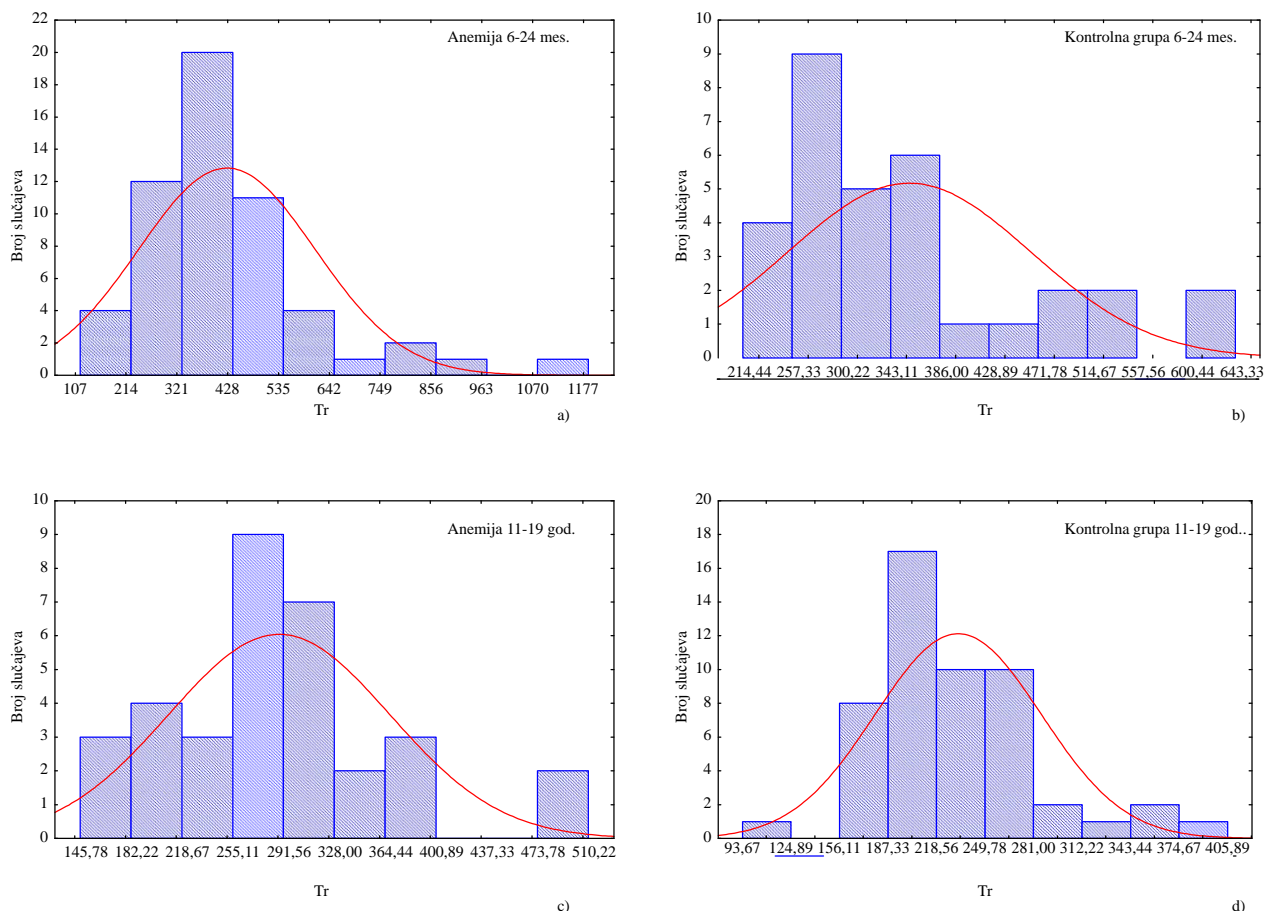
Parametar Hb za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 96,364 g/L, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 136,481 g/L. Između ove dve vrednosti postoji statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Hb 83,982 g/L, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Hb 115,750 g/L. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (a) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Hb za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.3. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Hb kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao i za status anemije, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.4. se vidi da faktor anemija grupe najviše utiče na vrednost parametara Hb, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe ima veliki značaj na vrednost parametara Hb, statistički značajno na nivou $p < 0,01$. Takođe se vidi da nelinearni član uzrast \times anemija ima izvestan uticaj, statistički značajno na nivou $p < 0,10$.

Tabela 4.1.4. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Hb.

	dF	Hb SS	Hb F	Hb p
Nulti član	1	1848221,46	10566,17	0,00
Uzrast	1	10618,53	60,71	0,00
anem	1	51345,43	293,54	0,00
Uzrast \times anem	1	644,55	3,68	0,06
Greška	165	28861,58		



Grafikon 4.1.4. Raspodela vrednosti parametra Tr za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi od 11-19 godina.

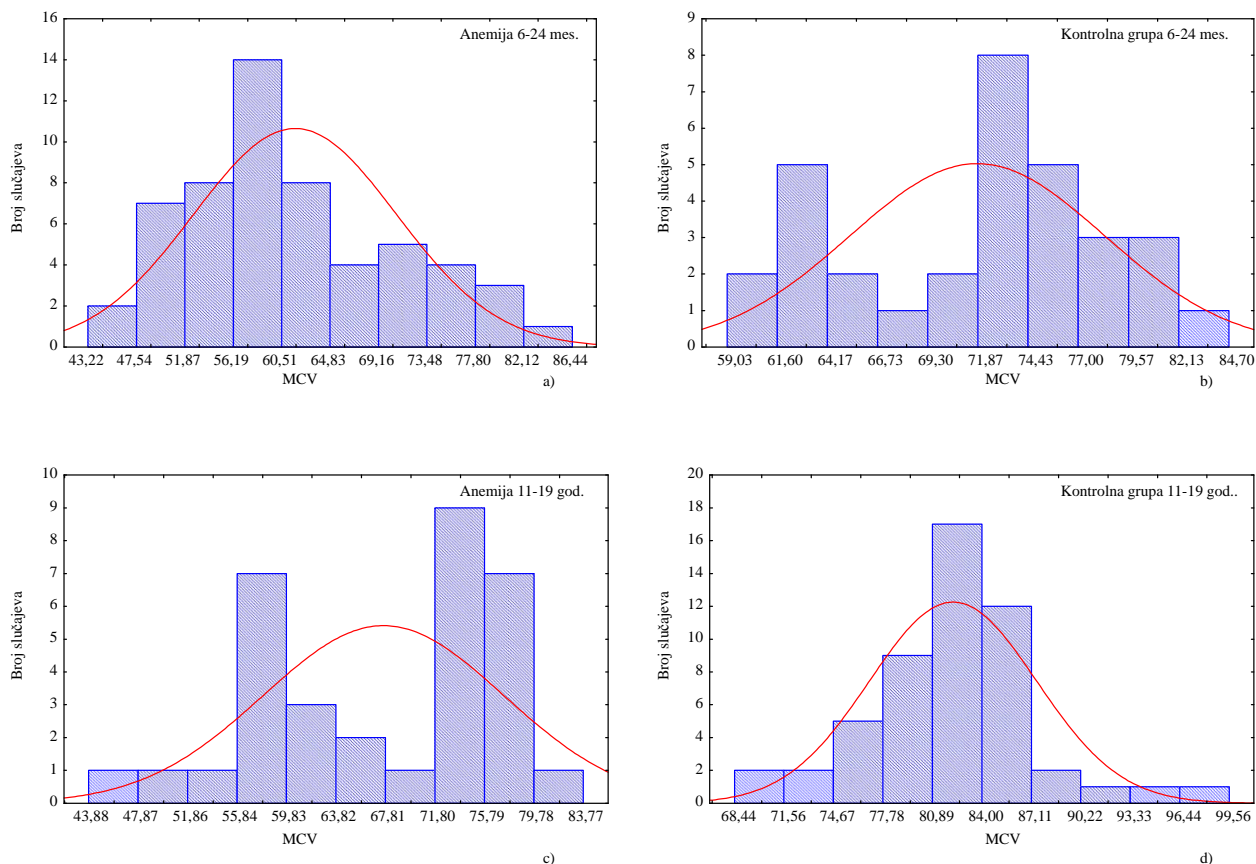
Parametar Tr za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $292,485 \times 10^9/L$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $217,231 \times 10^9/L$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Tr $426,357 \times 10^9/L$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Tr od $345,500 \times 10^9/L$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (a) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Tr za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.4. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Tr kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao i između statusa anemije za posmatrane uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-ovom HSD testu.

Iz tabele 4.1.5. se vidi da faktor uzrasta grupe najviše utiče na vrednost parametara Tr, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor anemije takođe ima statistički značajan uticaj na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.5. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Tr.

	dF	Tr SS	Tr F	Tr p
Nulti član	1	15967744,01	1069,88	0,00
Uzrast	1	630986,64	42,28	0,00
anem	1	301484,26	20,20	0,00
Uzrast × anem	1	5835,56	0,39	0,53
Greška	165	2462592,27		



Grafikon 4.1.5. Raspodela vrednosti parametra MCV za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

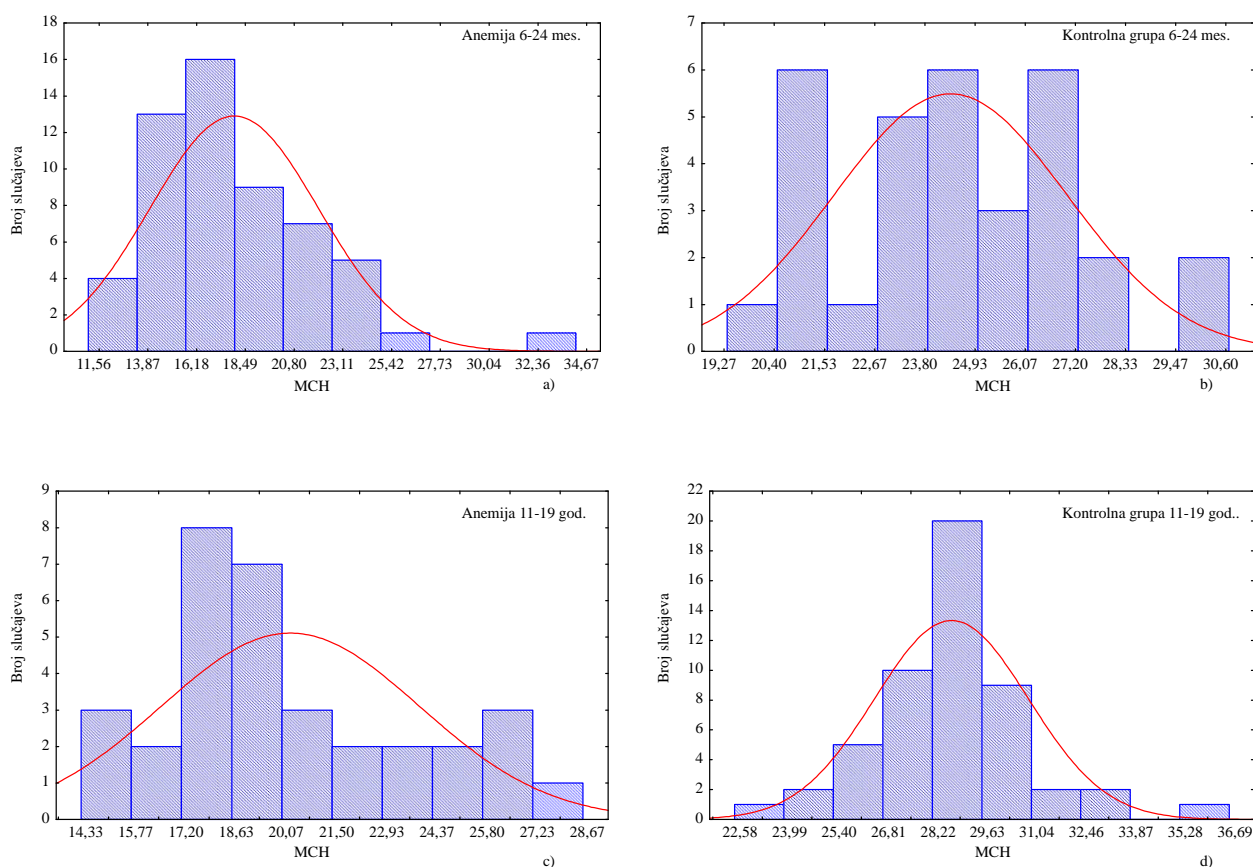
Parametar MCV za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $69,582 \times 10^{-15} / L$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $83,588 \times 10^{-15} / L$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost MCV $60,420 \times 10^{-15} / L$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost MCV od $72,919 \times 10^{-15} / L$. Takođe između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (a) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti MCV za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.5. prikazana je raspodela vrednosti za parametar MCV kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao i za status anemije, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.6. se vidi da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara MCV, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na parametar MCV, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.6. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar MCV.

	dF	MCV SS	MCV F	MCV p
Nulti član	1	810235,97	13192,82	0,00
Uzrast	1	3839,06	62,51	0,00
anem	1	6728,52	109,56	0,00
Uzrast × anem	1	35,41	0,58	0,45
Greška	165	10133,46		



Grafikon 4.1.6. Raspodela vrednosti parametra MCH za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

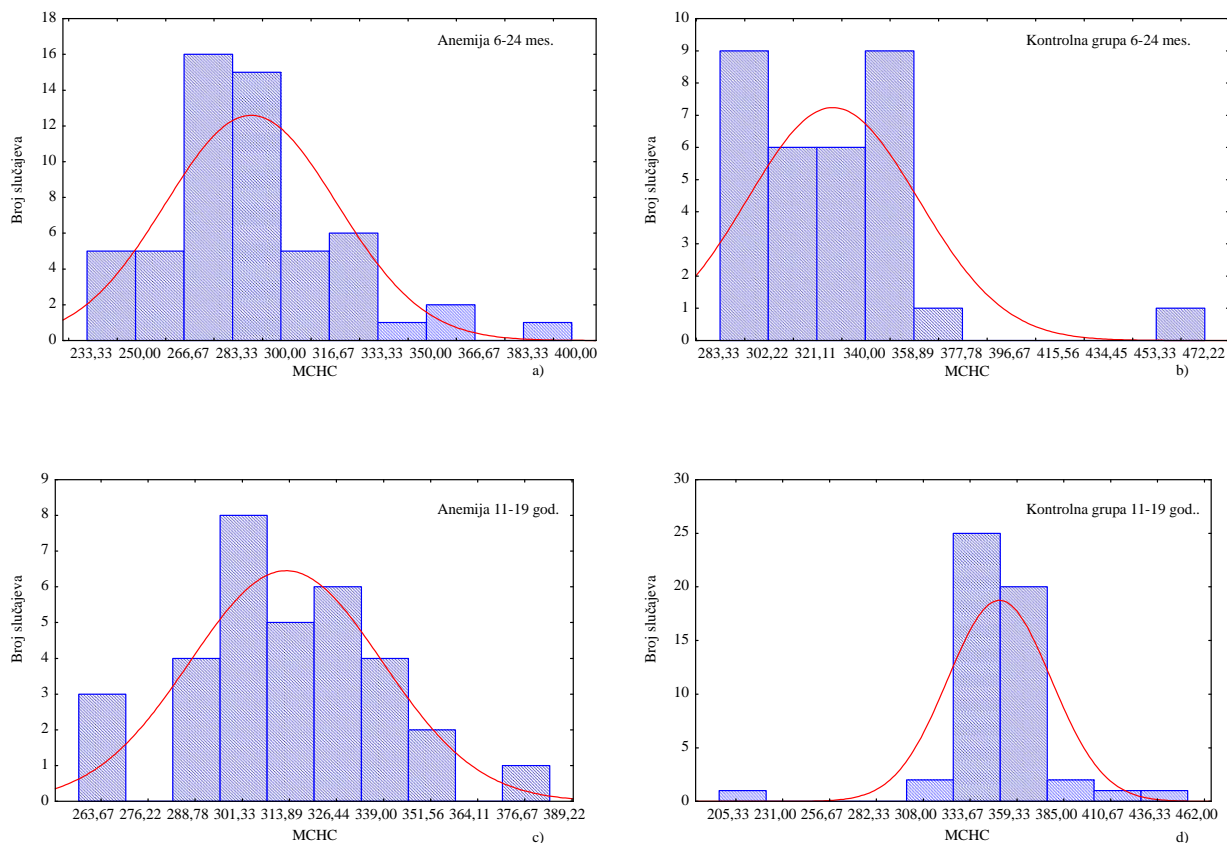
Parametar MCH za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $20,958 \times 10^{-12}/L$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $29,385 \times 10^{-12}/L$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost MCH $17,961 \times 10^{-12}/L$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost MCH od $24,381 \times 10^{-12}/L$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1 (a) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti MCH za posmatrane dve uzrasne grupe, kao i za status anemije.

Na grafikonu 4.1.6. prikazana je raspodela vrednosti za parametar MCH kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao i za status anemije, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.7. se vidi da faktor status anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara MCH, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe statistički značajno utiče na nivou $p < 0,01$. Takođe se vidi da nelinearni član uzrast \times anemija ima izvestan uticaj, statistički značajno na nivou $p < 0,10$.

Tabela 4.1.7. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar MCH.

	dF	MCH SS	MCH F	MCH p
Nulti član	1	85038,33	7999,61	0,00
Uzrast	1	604,93	56,91	0,00
anem	1	2176,93	204,79	0,00
Uzrast \times anem	1	39,37	3,70	0,06
Greška	165	1754,00		



Grafikon 4.1.7. Raspodela vrednosti parametra MCHC za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

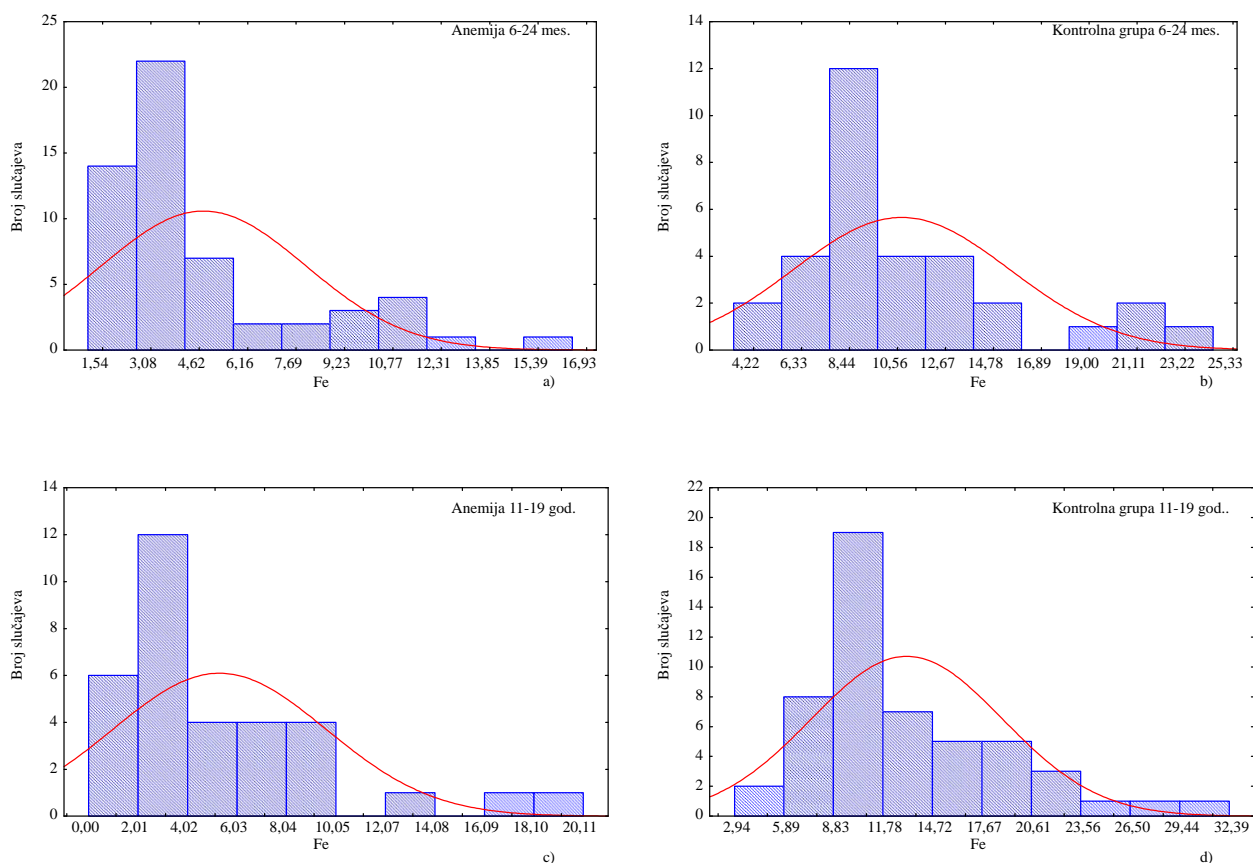
Parametar MCHC za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 313,030 g/L, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 349,731 g/L. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost MCHC 296,107 g/L, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost MCHC 336,531 g/L. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1 (a) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti MCHC za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.7. prikazana je raspodela vrednosti za parametar MCHC kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, dok postoji statistički značajna razlika između grupe ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.8. se vidi da faktor status anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara MCHC, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na parametar MCHC, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.8. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar MCHC.

	dF	MCHC SS	MCHC F	MCHC p
Nulti član	1	16604453,05	19210,87	0,00
Uzrast	1	7756,37	8,97	0,00
anem	1	60083,32	69,51	0,00
Uzrast × anem	1	213,06	0,25	0,62
Greška	165	142613,82		



Grafikon 4.1.8. Raspodela vrednosti parametra Fe za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

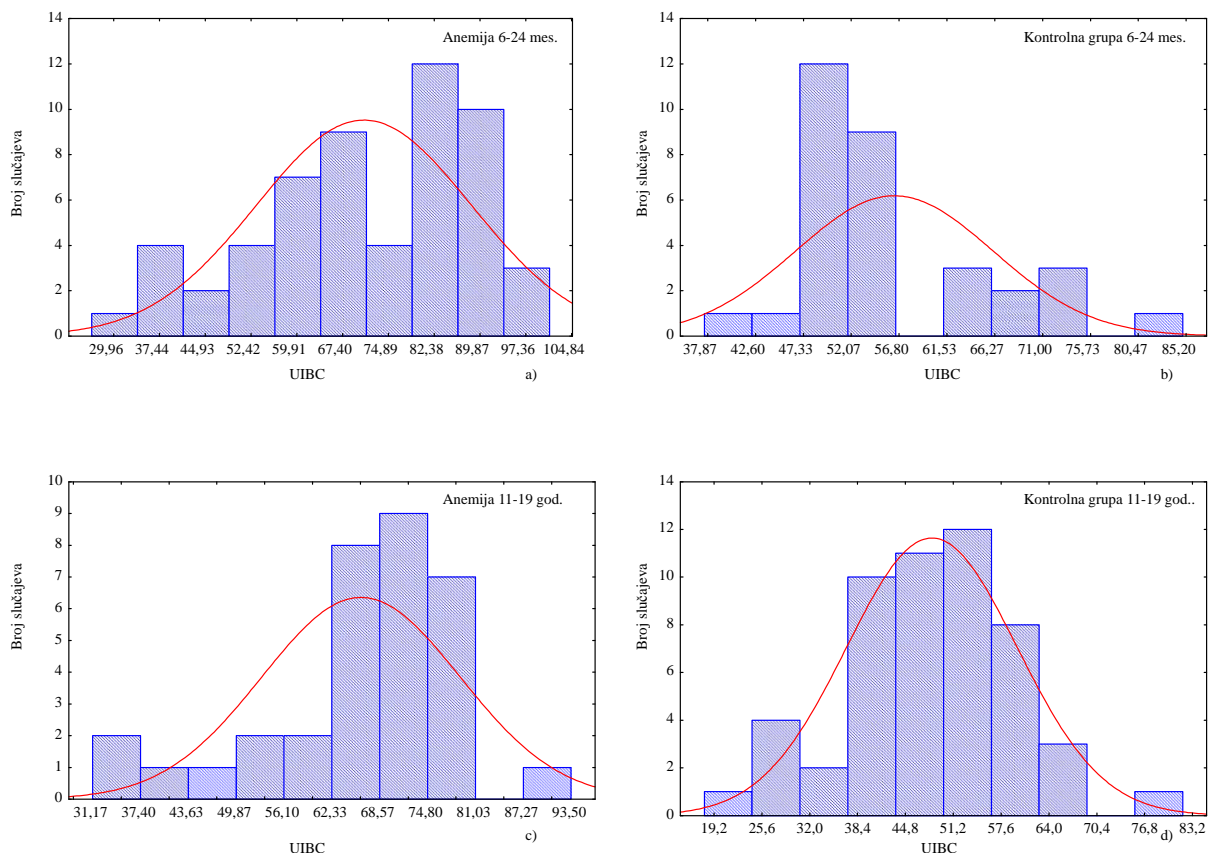
Parametar Fe za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 6,215 $\mu\text{mol/L}$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 14,186 $\mu\text{mol/L}$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Fe 4,751 $\mu\text{mol/L}$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Fe od 10,736 $\mu\text{mol/L}$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Fe za posmatrane dve uzrasne grupe, za kontrolnu grupu, dok za ispitanike kod kojih je postavljena dijagnoza anemije ne postoji statistički značajna razlika za ove dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.8. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Fe kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između kontrolnih grupa podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, dok ne postoji statistički značajna razlika između ispitanika kod kojih je postavljena dijagnoza anemije između ove dve uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.9. se vidi da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara Fe, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na parametar Fe, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.9. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Fe.

	dF	Fe SS	Fe F	Fe p
Nulti član	1	12730,62	595,73	0,00
Uzrast	1	234,57	10,98	0,00
anem	1	1889,92	88,44	0,00
Uzrast \times anem	1	43,50	2,04	0,16
Greška	165	3526,03		



Grafikon 4.1.9. Raspodela vrednosti parametra UIBC za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

Parametar UIBC za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 68,639, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 48,344. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost UIBC 70,887, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost UIBC od 56,334. Takođe između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti UIBC za posmatrane dve uzrasne grupe u kontrolnom uzorku, dok između ispitanika koji boluju od anemije ne postoji statistički značajna razlika.

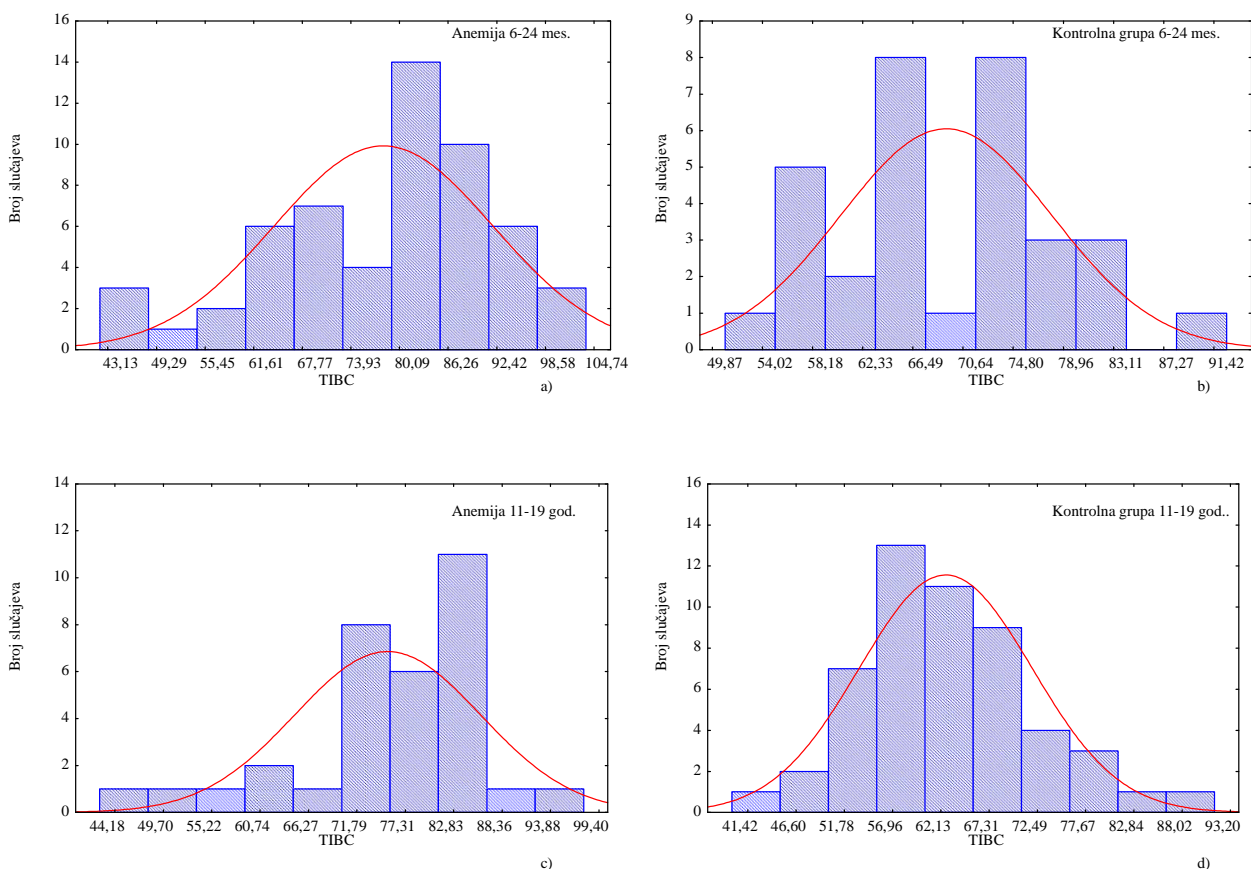
Na grafikonu 4.1.9. prikazana je raspodela vrednosti za parametar UIBC kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe u kontrolnom uzorku, dok između ispitanika kod kojih je postavljena dijagnoza

anemije ne postoji razlika između dve uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.10. vidi se da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara UIBC, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na vrednost parametara UIBC, statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Tabela 4.1.10. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar UIBC.

	dF	UIBC SS	UIBC F	UIBC p
Nulti član	1	589701,54	3060,58	0,00
Uzrast	1	1097,21	5,69	0,02
anem	1	11644,22	60,43	0,00
Uzrast × anem	1	382,96	1,99	0,16
Greška	165	31791,65		



Grafikon 4.1.10. Raspodela vrednosti parametra TIBC za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

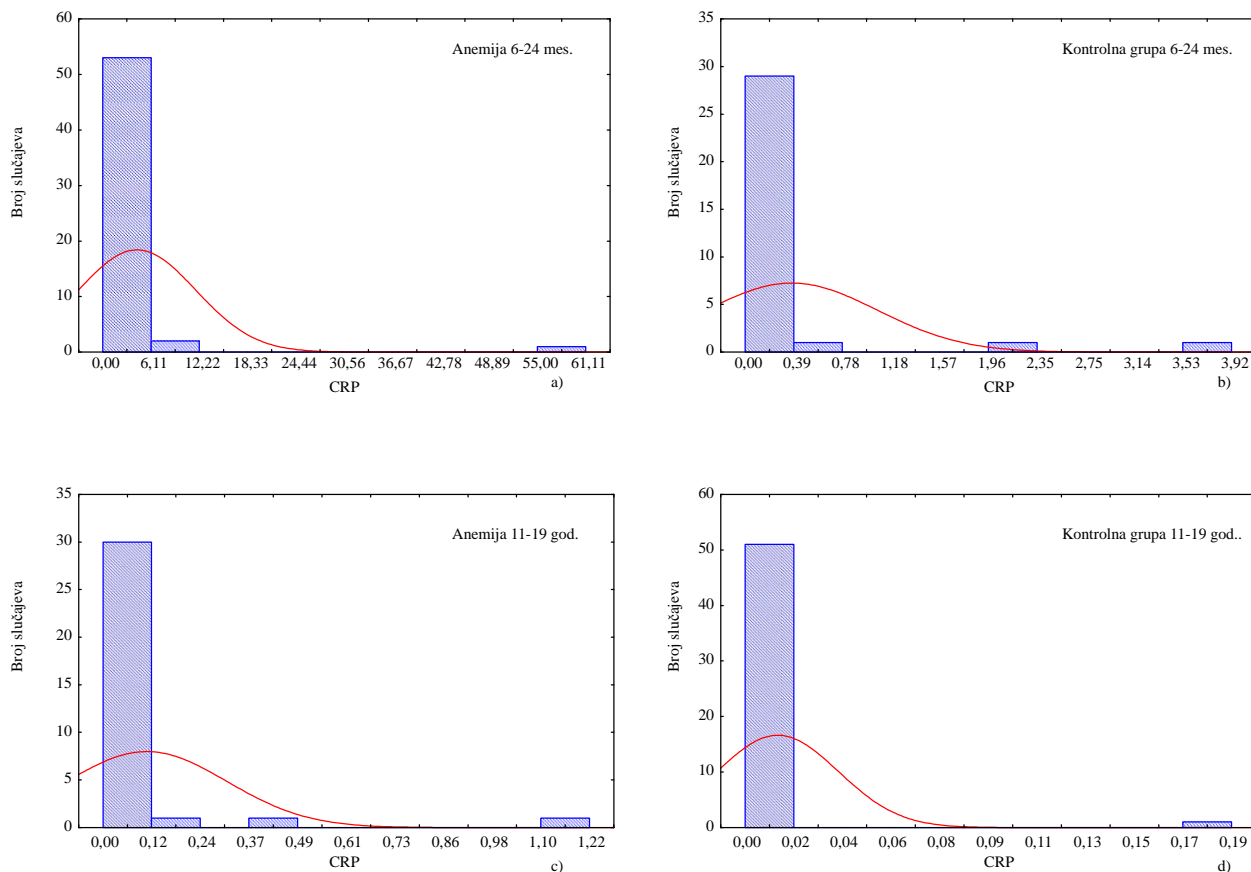
Parametar TIBC za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 75,294 $\mu\text{mol/L}$, dok je za kontrolnu istog uzrasta ta vrednost bila 62,652 $\mu\text{mol/L}$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost TIBC 78,057 $\mu\text{mol/L}$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost TIBC od 69,254 $\mu\text{mol/L}$. Takođe između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti TIBC za posmatrane dve uzrasne grupe za kontrolni uzorak, dok statistički značajna razlika između dve uzrasne grupe za ispitanike koji boluju od anemije ne postoji.

Na grafikonu 4.1.10. prikazana je raspodela vrednosti za parametar TIBC kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe za kontrolni uzorak, dok statistički značajna razlika između parametra TIBC za ispitanike koji boluju od anemije u dve uzrasne grupe nije uočena, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.11. se vidi da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara TIBC, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe značajno utiče, statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Tabela 4.1.11. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar TIBC.

	dF	TIBC SS	TIBC F	TIBC p
Nulti član	1	801385,07	6327,51	0,00
Uzrast	1	825,83	6,52	0,01
anem	1	4534,83	35,81	0,00
Uzrast \times anem	1	145,58	1,15	0,29
Greška	165	20897,41		



Grafikon 4.1.11. Raspodela vrednosti parametra CRP za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

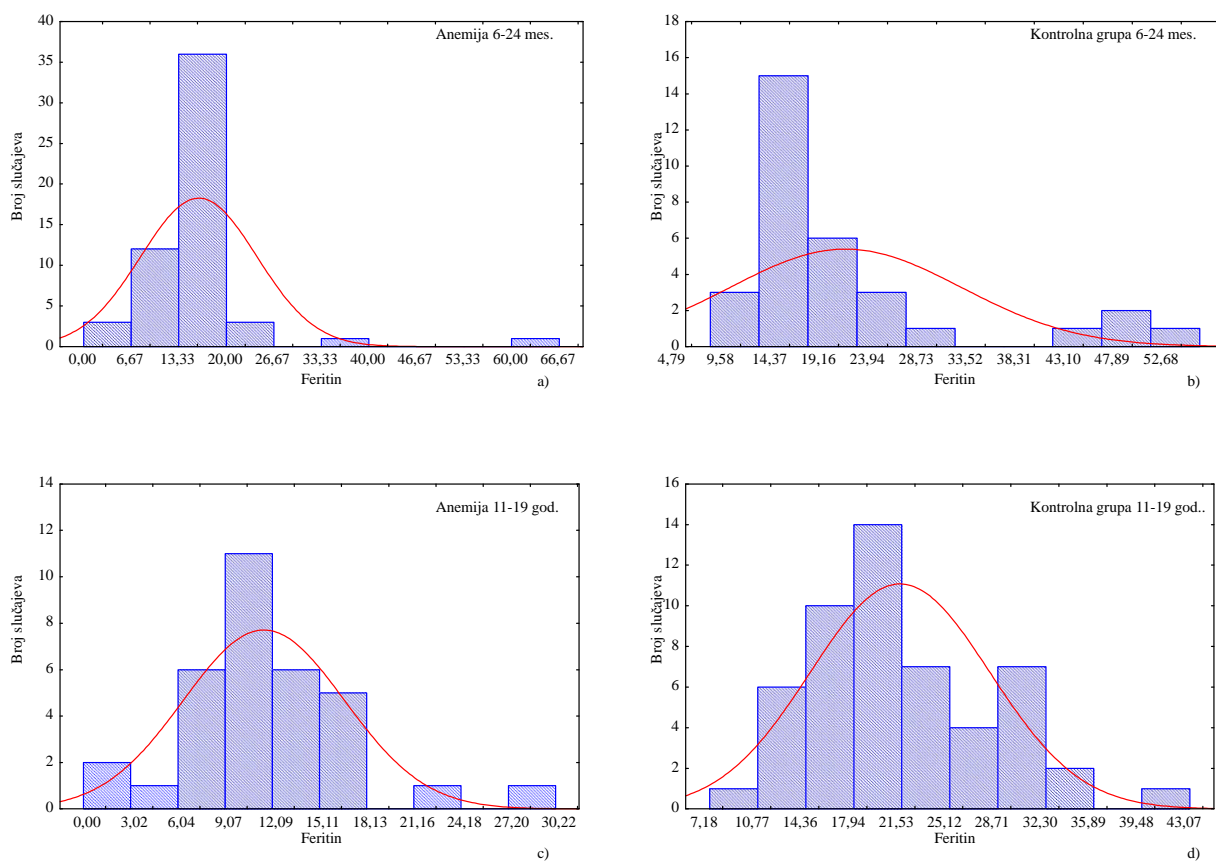
Parametar CRP za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 0,049 mg/L, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 0,003 mg/L. Između ove dve vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost CRP 1,291 mg/L, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost CRP 0,181 mg/L. Takođe, između ovih srednjih vrednosti nije uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti CRP za posmatrane dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.11. prikazana je raspodela vrednosti za parametar CRP kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.12. se vidi da nijedan od faktora ne utiče statistički značajno na vrednost parametara CRP.

Tabela 4.1.12. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar CRP.

	dF	CRP SS	CRP F	CRP p
Nulti član	1	20,19	1,10	0,30
Uzrast	1	17,36	0,95	0,33
anem	1	13,24	0,72	0,40
Uzrast × anem	1	11,24	0,61	0,43
Greška	165	3021,93		



Grafikon 4.1.12. Raspodela vrednosti parametra feritin za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

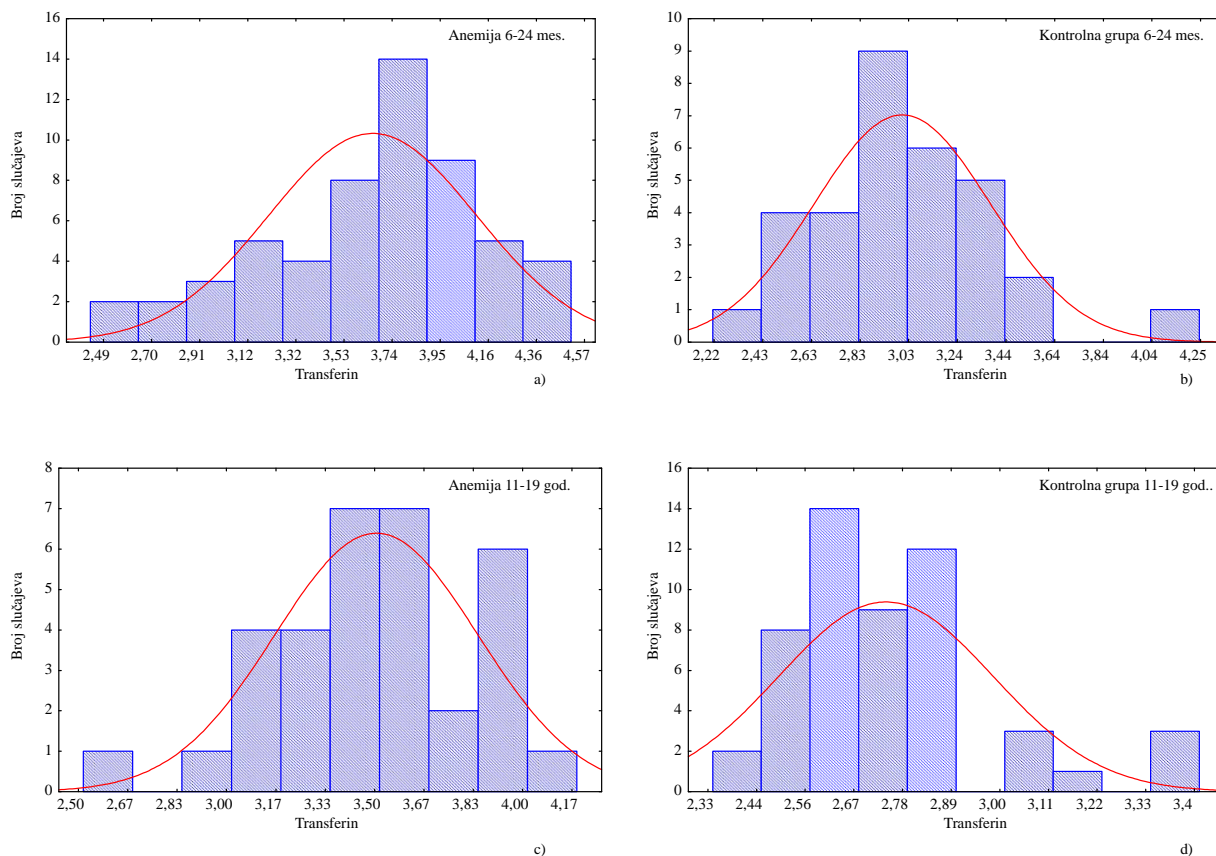
Parametar feritin za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 10,139 $\mu\text{g/L}$, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 20,429 $\mu\text{g/L}$. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost feritina 13,502 $\mu\text{g/L}$, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost feritina od 19,859 $\mu\text{g/L}$. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1 (b) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti feritina za posmatrane dve uzrasne grupe, ali da postoji statistički značajna razlika između ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe.

Na grafikonu 4.1.12. prikazana je raspodela vrednosti za parametar feritin kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, dok je uočena statistički značajna razlika između ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.13. vidi se da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara feritin, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.13. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar feritin.

	dF	Feritin SS	Feritin F	Feritin p
Nulti član	1	40346,55	622,28	0,00
Uzrast	1	78,49	1,21	0,27
anem	1	2737,69	42,22	0,00
Uzrast \times anem	1	151,46	2,34	0,13
Greška	165	10698,02		



Grafikon 4.1.13. Raspodela vrednosti parametra transferin za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

Parametar transferin za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 3,506 g/L, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 2,740 g/L. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost transferina 3,656 g/L, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost transferina od 3,007 g/L. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti transferina za posmatrane dve uzrasne grupe za kontrolnu grupu ispitanika, dok nije uočena statistički značajna razlika za ispitanike koji boluju od anemije između ove dve uzrasne grupe.

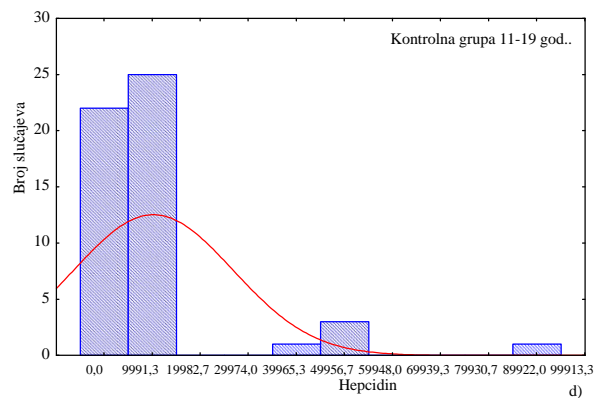
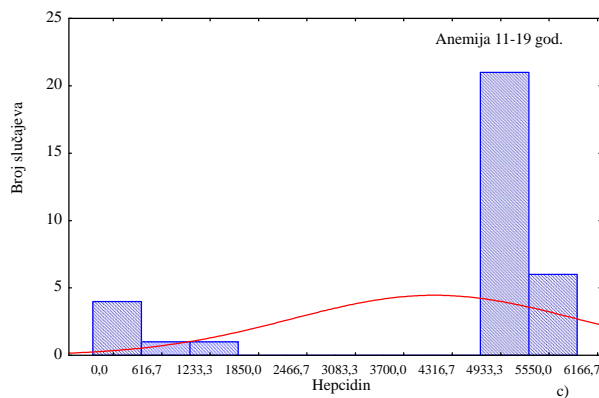
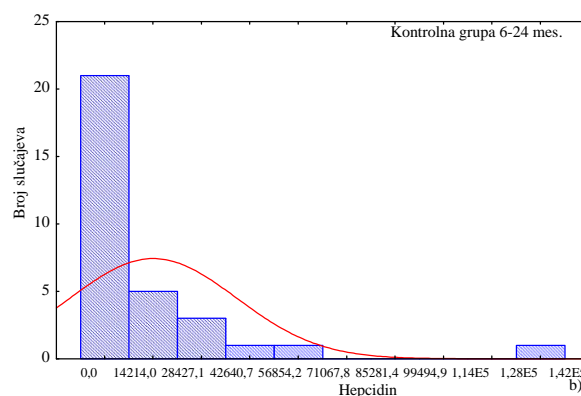
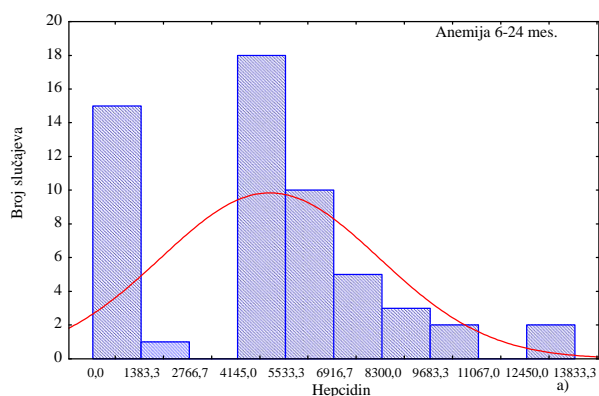
Na grafikonu 4.1.13. prikazana je raspodela vrednosti za parametar transferin kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se

uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, za kontrolnu grupu, dok nije uočena statistički značajna razlika za ispitanike koji boluju od anemije između dve posmatrane uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.14. vidi se da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara transferina, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na vrednost parametara transferina, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.14. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar transferin.

	dF	Transferin SS	Transferin F	Transferin p
Nulti član	1	1645,35	12382,76	0,00
Uzrast	1	1,77	13,32	0,00
anem	1	19,12	143,91	0,00
Uzrast × anem	1	0,19	1,45	0,23
Greška	165	21,92		



Grafikon 4.1.14. Raspodela vrednosti parametra hepcidin za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

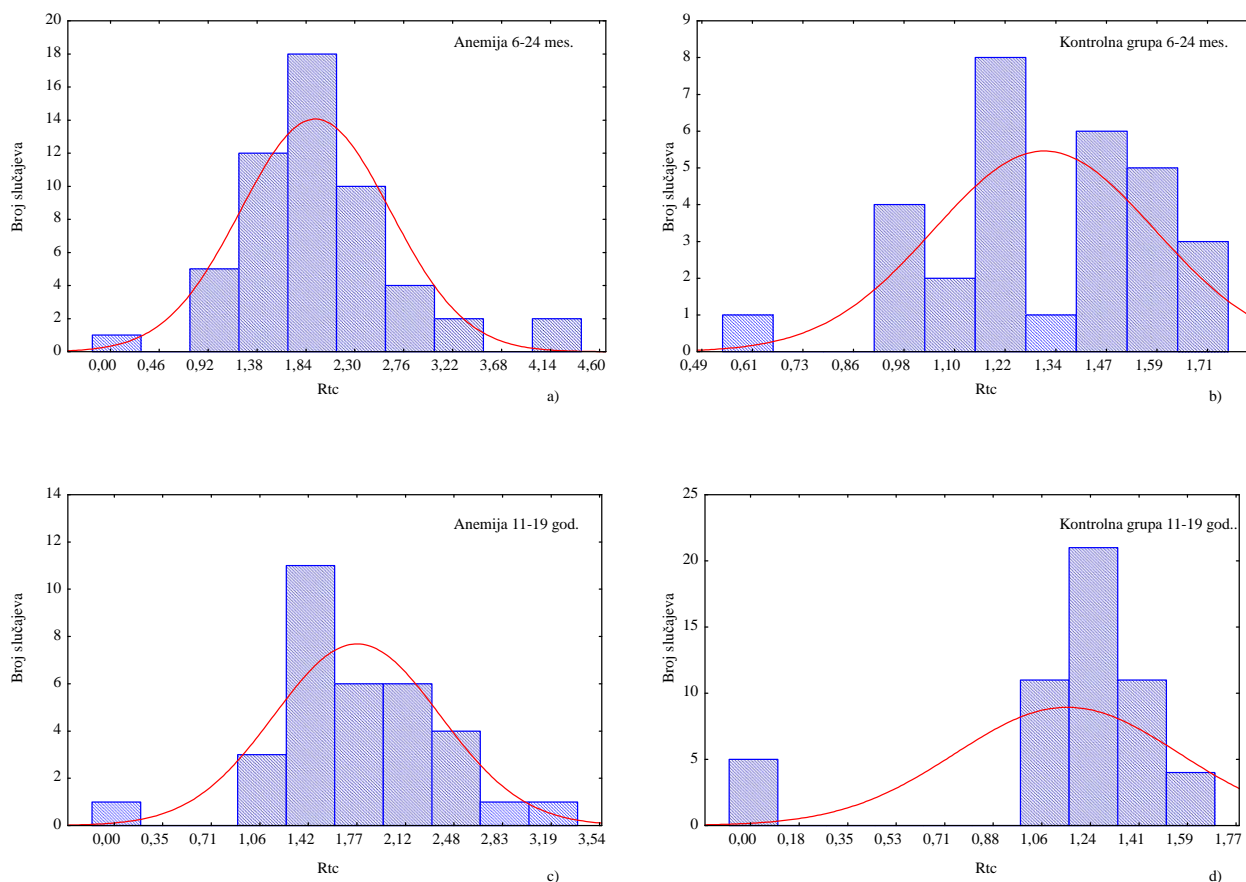
Parametar hepcidin za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost $4,1 \times 10^3$ pg/mL, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila $1,0 \times 10^4$ pg/mL. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost hepcidina $4,4 \times 10^3$ pg/mL, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost hepcidina od $1,4 \times 10^4$ pg/mL. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1 (b) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti hepcidina za posmatrane dve uzrasne grupe, dok postoji statistički značajna razlika između vrednosti hepcidina za ispitanike koji boluju od anemije i ispitanike iz kontrolne grupe.

Na grafikonu 4.1.14. prikazana je raspodela vrednosti za parametar hepcidin kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, a da je uočena statistički značajna razlika u ovom parametru između ispitanika koji boluju od anemije i ispitanika iz kontrolne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.15. se vidi da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara hepcidina, statistički značajno na nivou $p < 0,01$.

Tabela 4.1.15. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar hepcidin.

	dF	Hepcidin SS	Hepcidin F	Hepcidin p
Nulti član	1	1,1E+10	56,19	0,00
Uzrast	1	2,5E+08	1,23	0,27
anem	1	2,8E+09	13,90	0,00
Uzrast × anem	1	1,9E+08	0,96	0,33
Greška	165	3,3E+10		



Grafikon 4.1.15. Raspodela vrednosti parametra Rtc za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

Parametar Rtc za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 1,770, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 1,152. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Rtc 1,929, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Rtc od 1,317. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Rtc za posmatrane dve uzrasne grupe, a statistički značajna razlika između grupe ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe postoji.

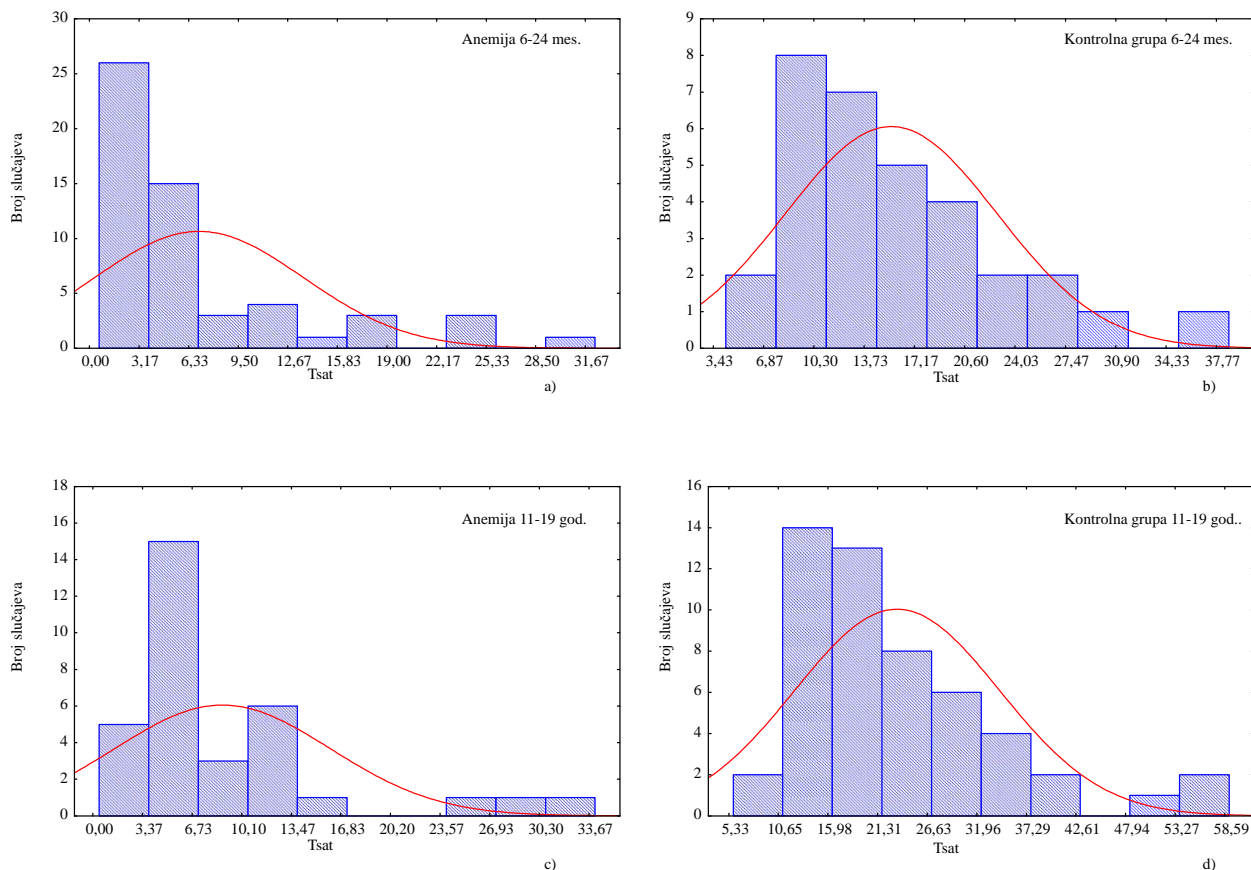
Na grafikonu 4.1.15. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Rtc kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane

uzrasne grupe, dok postoji statistički značajna razlika između grupe ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.16. se vidi da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara Rtc, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta utiče statistički značajno na nivou $p < 0,10$.

Tabela 4.1.16. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Rtc.

	dF	Rtc SS	Rtc F	Rtc p
Nulti član	1	375,21	1270,46	0,00
Uzrast	1	1,03	3,49	0,06
anem	1	14,93	50,55	0,00
Uzrast × anem	1	0,00	0,00	0,97
Greška	165	48,73		



Grafikon 4.1.16. Raspodela vrednosti parametra Tsat za: a) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, b) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 6-24 meseca, c) grupu ispitanika koji boluju od anemije u uzrasnoj grupi 11-19 godina, d) kontrolnu grupu u uzrasnoj grupi 11-19 godina.

Parametar Tsat (procenat saturacije transferina) za ispitanike koji boluju od anemije za uzrast 11-19 godina dostigao je srednju vrednost 8,791%, dok je za kontrolnu grupu istog uzrasta ta vrednost bila 23,404%. Između ove dve vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Za uzrasnu grupu 6-24 meseca uočeno je da grupa ispitanika koji boluju od anemije ima srednju vrednost Tsat 6,998%, dok kontrolna grupa ispitanika ima srednju vrednost Tsat od 15,583%. Takođe, između ovih srednjih vrednosti je uočena statistički značajna razlika po Tukey-evom HSD testu. Iz tabele 4.1.1. (b) se vidi da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti Tsat sa posmatrane dve uzrasne grupe za kontrolnu grupu, dok nije uočena statistički značajna razlika vrednosti Tsat za ispitanike koji boluju od anemije između dve uzrasne grupe.

Na grafikonu 4.1.16. prikazana je raspodela vrednosti za parametar Tsat kao i aproksimacija normalne raspodele za tu grupu podataka (linija crvene boje). Na grafikonu se

uočava da postoji statistički značajna razlika između grupe podataka za dve posmatrane uzrasne grupe, za kontrolnu grupu, dok za grupu ispitanika koji boluju od sideropenijske anemije nije uočena statistički značajna razlika između dve uzrasne grupe, kao što je pokazano i po Tukey-evom HSD testu.

Iz tabele 4.1.17. vidi se da faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara Tsat, statistički značajno na nivou $p < 0,01$, dok faktor uzrasta takođe utiče na vrednost parametra Tsat, statistički značajno na nivou $p < 0,01$. Takođe se vidi da nelinearni član $\text{uzrast} \times \text{anemija}$ ima uticaj, statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Tabela 4.1.17. Faktorijelna analiza varijanse (ANOVA) za parametar Tsat.

	dF	Tsat SS	Tsat F	Tsat p
Nulti član	1	29699,17	412,41	0,00
Uzrast	1	893,41	12,41	0,00
anem	1	5228,99	72,61	0,00
Uzrast \times anem	1	379,24	5,27	0,02
Greška	165	11882,29		

Tabela 4.1.18. Korelacija promenljivih za ispitanike koji boluju od anemije i zdrave ispitanike za uzrast 6-24 meseca i 11-19 godina

	Er	Hb	Tr	MCV	MCH	MCHC	Fe	UIBC	TIBC	CRP	Feritin	Trans	Hepcidin	Rtc	Tsat
Le	0,186*	-0,242 ⁺	0,500 ⁺	-0,313 ⁺	-0,316 ⁺	-0,233 ⁺	-0,155*	0,151	0,156*	0,204 ⁺		0,224 ⁺			-0,154*
Er		0,202 ⁺									0,174*				-0,165*
Hb			-0,460 ⁺	0,828 ⁺	0,885 ⁺	0,672 ⁺	0,753 ⁺	-0,699 ⁺	-0,615 ⁺		0,521 ⁺	-0,763 ⁺			-0,640 ⁺ 0,736 ⁺
Tr				-0,455 ⁺	-0,471 ⁺	-0,338 ⁺	-0,342 ⁺	0,286 ⁺	0,230 ⁺		-0,202 ⁺	0,374 ⁺			0,155* -0,332 ⁺
MCV					0,894 ⁺	0,526 ⁺	0,618 ⁺	-0,643 ⁺	-0,561 ⁺		0,381 ⁺	-0,654 ⁺	0,183*	-0,519*	0,611*
MCH						0,781 ⁺	0,680 ⁺	-0,704 ⁺	-0,654 ⁺		0,399 ⁺	-0,706 ⁺	0,175*	-0,547 ⁺	0,692 ⁺
MCHC							0,473 ⁺	-0,484 ⁺	-0,490 ⁺		0,273 ⁺	-0,506 ⁺		-0,446 ⁺	0,482 ⁺
Fe								-0,744 ⁺	-0,550 ⁺		0,489 ⁺	-0,623 ⁺	0,166*	-0,444 ⁺	0,971 ⁺
UIBC									0,915 ⁺		-0,468 ⁺	0,676 ⁺		0,452 ⁺	-0,819 ⁺
TIBC											-0,409 ⁺	0,601 ⁺		0,409 ⁺	-0,673 ⁺
Feritin												-0,558 ⁺	0,322 ⁺	-0,328 ⁺	0,490 ⁺
Trans													-0,171*	0,584 ⁺	-0,616 ⁺
Hepcidin														-0,134**	0,144**
Rtc															-0,426 ⁺

⁺Korelacija je statistički značajna na nivou $p < 0,01$; *Korelacija je statistički značajna na nivou $p < 0,05$; **Korelacija je statistički značajna na nivou $p < 0,10$.

Iz tabele 4.1.18. se vidi da je broj leukocita u pozitivnoj korelaciji sa brojem trombocita, C-reaktivnim proteinom, koncentracijom transferina ($p < 0,01$), kao i u negativnoj korelaciji sa koncentracijom hemoglobina, MCV, MCH, MCHC ($p < 0,01$). Broj leukocita je, takođe, u pozitivnoj korelaciji sa brojem eritrocita, UIBC, TIBC ($p < 0,05$) i negativnoj korelaciji sa koncentracijom gvožđa u serumu i procentom saturacije transferina ($p < 0,05$).

Broj eritrocita je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom hemoglobina u serumu ($p < 0,01$). Takođe, ovaj parametar je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom feritina, a u negativnoj korelaciji sa MCV, MCH i brojem retikulocita ($p < 0,05$).

Koncentracija hemoglobina je u pozitivnoj korelaciji sa MCV, MCH, MCHC, koncentracijom gvožđa i feritina i procentom saturacije transferina, dok je u negativnoj korelaciji sa brojem trombocita, UIBC, TIBC, koncentracijom transferina, brojem retikulocita ($p < 0,01$).

Broj trombocita je u pozitivnoj korelaciji sa UIBC, TIBC i koncentracijom transferina, dok je u negativnoj korelaciji sa MCV, MCH, MCHC, koncentracijom gvožđa i feritina i procentom saturacije transferina ($p < 0,01$). Broj trombocita je, takođe, u pozitivnoj korelaciji sa brojem retikulocita ($p < 0,05$).

Parametar MCV je u pozitivnoj korelaciji sa MCH, MCHC, koncentracijom gvožđa i feritina, kao i negativnoj korelaciji sa UIBC, TIBC i koncentracijom transferina ($p < 0,01$). Takođe, MCV je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom hepcidina u serumu i procentom saturacije transferina, a u negativnoj korelaciji sa brojem retikulocita ($p < 0,05$).

Parametar MCH je u pozitivnoj korelaciji sa MCHC, koncentracijom gvožđa i feritina i procentom saturacije transferina, kao i u negativnoj korelaciji sa UIBC i TIBC, koncentracijom transferina i brojem retikulocita ($p < 0,01$).

Parametar MCHC je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom gvožđa i feritina i procentom saturacije transferina, kao i negativnoj korelaciji sa UIBC, TIBC, koncentracijom transferina i brojem retikulocita ($p < 0,01$).

Koncentracija gvožđa u serumu je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom feritina i procentom saturacije transferina, kao i u negativnoj korelaciji sa UIBC i TIBC, koncentracijom transferina i brojem retikulocita ($p < 0,01$). Koncentracija gvožđa u serumu je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom hepcidina ($p < 0,05$).

Parametar UIBC je u pozitivnoj korelaciji sa TIBC, koncentracijom transferina i brojem retikulocita, dok je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom feritina i procentom saturacije transferina ($p < 0,01$).

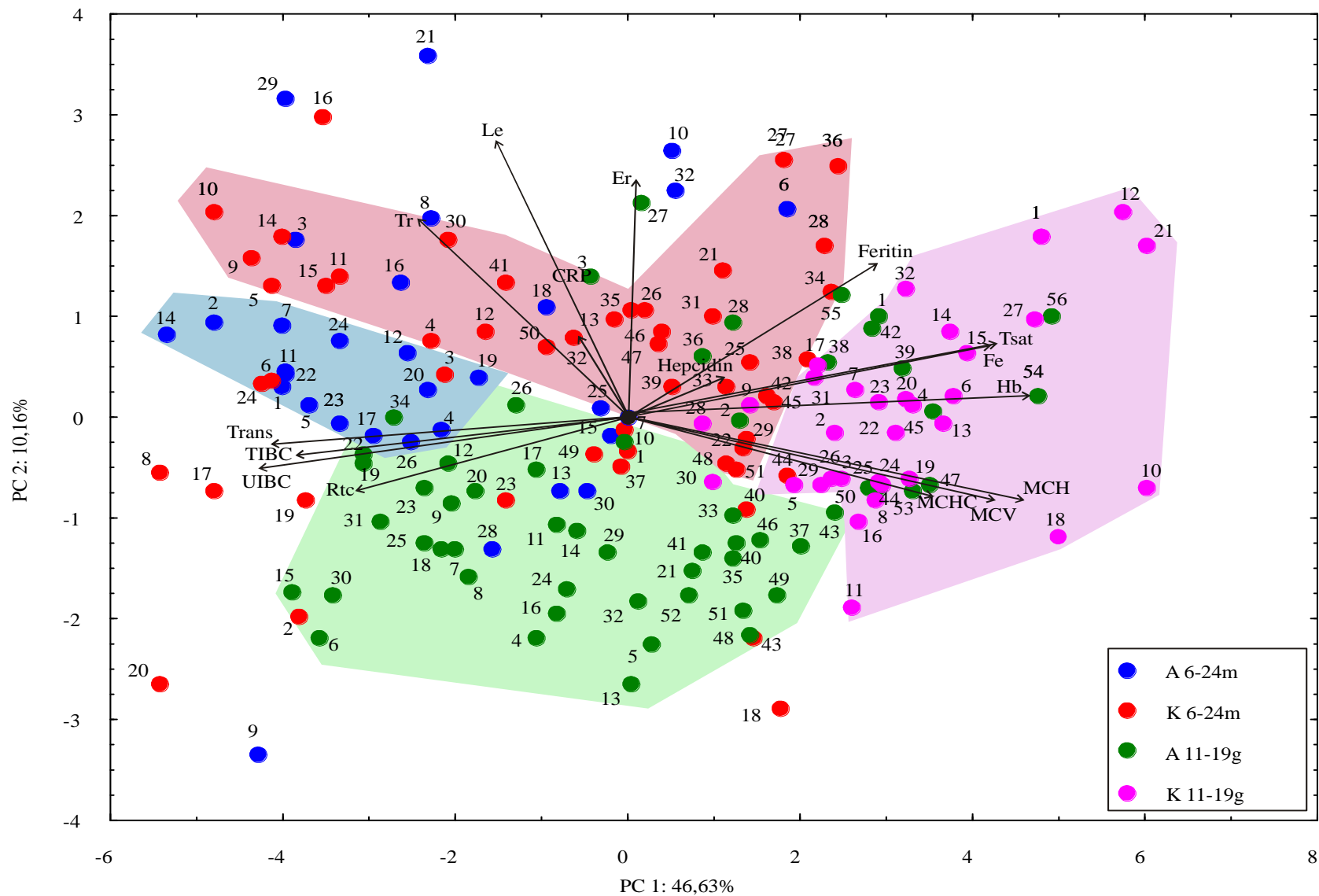
Parametar TIBC je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom transferina i brojem retikulocita, a u negativnoj korelaciji sa koncentracijom feritina i procentom saturacije transferina ($p < 0,01$).

Koncentracija feritina je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom hepcidina i procentom saturacije transferina, a u negativnoj korelaciji sa koncentracijom transferina i brojem retikulocita ($p < 0,01$).

Koncentracija transferina je u pozitivnoj korelaciji sa brojem retikulocita, a u negativnoj korelaciji sa procentom saturacije transferina ($p < 0,01$), kao i u negativnoj korelaciji sa koncentracijom hepcidina ($p < 0,05$).

Koncentracija hepcidina u serumu je pozitivnoj korelaciji sa procentom saturacije transferina, a u negativnoj korelaciji sa brojem retikulocita ($p < 0,10$).

Broj retikulocita je u negativnoj korelaciji sa procentom saturacije transferina ($p < 0,01$).



Grafikon 4.1.17. Biplot grafikon za PCA analizu posmatranih parametara i grupa ispitanika.

A – ispitanici koji boluju od anemije, K – kontrolna grupa

Na grafikonu 4.1.17. su prikazani položaji tačaka koji predstavljaju projekcije višeparametarskog sistema podataka u prvoj faktorskoj ravni. Pozicije ovih tačaka su dobijene na osnovu vrednosti laboratorijskih analiza za svakog ispitanika. Usmerenost vektora u faktorskoj ravni (svaki od ovih vektora predstavlja jedan mereni podatak) je uslovljena doprinosom merenog podatka u izračunavanju faktorske koordinate. U smeru porasta vektora datog merenog podatka raste i vrednost tog merenog podatka za određenu tačku. Takođe, usmerenost vektora u odnosu na ostale vektore pokazuje da li postoji korelacija između odgovarajućih merenih podataka. Tako, na grafikonu 4.1.17. se vidi da su parametri transferin, UIBC, TIBC kao i Rtc u pozitivnoj korelaciji i da je njihova korelacija sa parametrima Tsat, Fe i Hb negativna. Takođe, sa ovog grafikona se vidi da su korelacije Tsat, Fe i Hb pozitivne, kao i da su parametri MCV, MCH i MCHC u pozitivnoj korelaciji. Svi ovi nalazi odgovaraju korelacionoj analizi iz tabele 4.1.18.

Na grafikonu 4.1.17. se vidi da su grupe podataka za ispitanike koji boluju od anemije i za kontrolnu grupu ispitanika, za dve posmatrane uzrasne grupe dobro razdvojeni u prvoj faktorskoj ravni. Prva faktorska koordinata je prikazala 46,63% ukupne varijanse, dok je druga faktorska koordinata prikazala 10,16% ukupne varijanse. Na grafikonu se vidi da su ispitanici kod kojih je dijagnostikovana anemija grupisani na levoj i donjoj strani (povećane vrednosti transferina, TIBC, UIBC i Rtc). Primećuje se da su ispitanici koji boluju od anemije iz uzrasne grupe 6-24 meseca dobro razdvojeni od uzrasne grupe 11-19 godina i da mahom imaju izraženije vrednosti parametara transferina, TIBC, UIBC i Rtc. Kontrolna grupa ispitanika uzrasta 6-24 meseca se nalazi na gornjoj strani grafikona i ima izraženije vrednosti parametara Tr, Le, CRP, Er, dok se kontrolna grupa ispitanika uzrasta 11-19 godina nalazi na desnoj strani grafikona i ima povećane vrednosti parametara feritin, hepcidin, Fe, Tsat, Hb, MCH, MCV i MCHC.

4.2 LINEARNI MODEL

U ovom poglavlju je razvijen matematički model za određivanje prisustva anemije kod ispitanika na osnovu pokazivanja parametara uzrast, Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat. Ovaj model je razvijen u obliku linearnog modela sa konstantnim koeficijentima.

U ANOVA tabeli 4.2.1 su određeni uticaji merenih parametara na prisustvo anemije kod ispitanika. Iz ove tabele se vidi da su najveći uticaj na model imali parametri uzrast, transferin, MCH, Er i hepcidin, statistički značajno na nivou $p < 0,01$. Uticaj Tr i feritina je takođe bio statistički značajan na nivou $p < 0,10$. Koeficijent determinacije (r^2) koji je dobijen u ovom modelu bio je 0,753 i kao takav se ne može smatrati prihvatljivim za određivanje prisustva sideropenijske anemije kod ispitanika. Iz tabele 4.2.1. se vidi da parametri Er, MCH, transferin i hepcidin imaju veoma značajan uticaj na određivanje prisustva sideropenijske anemije kod ispitanika i da je uticaj na formiranje linearnog modela statistički značajan na nivou $p < 0,01$. Iz ove analize se vidi da se hepcidin može smatrati parametrom koji ukazuje na snižene rezerve telesnog gvožđa, pre pojave klinički i laboratorijski manifestne sideropenijske anemije.

Tabela 4.2.1. ANOVA

	SS	df	MS	F	p
Uzrast	1,134	1	1,134	16,414	0,000
Le	0,002	1	0,002	0,026	0,873
Er	0,604	1	0,604	8,749	0,004
Hb	0,169	1	0,169	2,452	0,119
Tr	0,262	1	0,262	3,799	0,053
MCV	0,124	1	0,124	1,789	0,183
MCH	0,952	1	0,952	13,787	0,000
MCHC	0,079	1	0,079	1,145	0,286
Fe	0,142	1	0,142	2,050	0,154
UIBC	0,000	1	0,000	0,001	0,977
TIBC	0,015	1	0,015	0,218	0,641
CRP	0,000	1	0,000	0,001	0,970
Feritin	0,198	1	0,198	2,872	0,092
Trans	1,098	1	1,098	15,898	0,000
Hepcidin	0,536	1	0,536	7,754	0,006
Rtc	0,031	1	0,031	0,455	0,501
Tsat	0,141	1	0,141	2,042	0,155
Greška	10,430	151	0,069		

U tabeli 4.2.2. prikazani su koeficijenti linearnog modela predikcije prisustva anemije kod ispitanika na osnovu merenih vrednosti Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat.

Tabela 4.2.2. Regresioni koeficijenti linearnog modela.

	Regr. koefic.	SD	t(151)	p	Donji limit 95%	Gornji limit 95%
Nulti član	0,189	0,598	0,317	0,752	-0,992	1,371
Uzrast	0,049	0,012	4,051	0,000	0,025	0,073
Le	-0,001	0,008	-0,160	0,873	-0,017	0,014
Er	0,176	0,059	2,958	0,004	0,058	0,293
Hb	0,005	0,003	1,566	0,119	-0,001	0,012
Tr	0,000	0,000	-1,949	0,053	-0,001	0,000
MCV	-0,007	0,005	-1,338	0,183	-0,018	0,003
MCH	0,065	0,017	3,713	0,000	0,030	0,099
MCHC	-0,001	0,001	-1,070	0,286	-0,004	0,001
Fe	0,030	0,021	1,432	0,154	-0,011	0,071
UIBC	0,000	0,005	-0,029	0,977	-0,009	0,009
TIBC	0,003	0,005	0,467	0,641	-0,008	0,013
CRP	0,000	0,005	0,038	0,970	-0,010	0,010
Feritin	-0,005	0,003	-1,695	0,092	-0,012	0,001
Trans	-0,276	0,069	-3,987	0,000	-0,413	-0,139
Hepcidin	0,000	0,000	2,785	0,006	0,000	0,000
Rtc	0,030	0,044	0,675	0,501	-0,058	0,117
Tsat	-0,017	0,012	-1,429	0,155	-0,041	0,007

Iz tabele 4.2.2. se uočava da regresioni koeficijenti u linearnom modelu Er, MCH, transferin i hepcidin imaju veoma značajanu ulogu u formiranju ovog modela, kao i na određivanje prisustva sideropenijske anemije kod ispitanika ($p < 0,01$).

4.3 MODEL NEURONSKE MREŽE

Broj skrivenih neurona varirao je od $n = 5 - 10$, što je predloženo programom (StatSoft Statistica). Bilo je $x = 3$ ulaza, $y = 1$ izlaz, i $m = 134$ težinskih koeficijenata. Za modelovanje ANN upotrebljen je BFGS algoritam, koji je ugrađen u primenjeni program. Rezultati za prisustvo anemije kod ispitanika dobijeni na osnovu parametara uzrasta, Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat tokom testiranja sa 17 neurona u skrivenom sloju su prikazani u tabeli 4.3.1. Ova tabela prikazuje r^2 vrednosti za svaku od proučavanih promenljivih tokom faza učenja, testiranja i validacije.

Primenjeni MLP su označeni u StatSoft Statistica programu na sledeći način: nakon oznake MLP sledi broj ulaza, broj neurona u skrivenom sloju, a zatim broj izlaza. Optimalni broj skrivenih neurona je izabran minimiziranjem razlika između vrednosti predviđenih mrežom i onih eksperimentalno dobijenih. Kao indikatori performanse mreža korišćene su sume r^2 i sume SOS između merenih i izračunatih izlaza za svaku dobijenu ANN, tokom faza učenja, testiranja i validacije.

Učinak (performanse) ANN utvrđen je na osnovu sume svih r^2 (što veća vrednost) i sume svih SOS (što manja vrednost) za sve promenljive u jednoj mreži. Na osnovu toga pronađen je optimalni broj skrivenih neurona, 7 (tabela 4.3.1). SOS vrednosti su takođe upotrebljene kao kriterijum za završetak iteracije mreže, što je obuhvaćeno primenjenim programom. Čim SOS počne da raste, zaustavlja se faza „učenja“ mreže, a ako do toga ne dođe ova faza se završava nakon fiksiranog broja ciklusa (128).

U tabeli broj 4.3.1. prikazani su rezultati predikcije optimalnog modela neuronske mreže za prisustvo anemije kod ispitanika na osnovu ulaznih parametara uzrast, Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat.

Tabela 4.3.1. Performanse ANN mreže

Ime mreže	Performanse			Greška			Algor. za učenje	Funkc. za greške.	Aktivac. skriv. sloj	Aktivac. Izlaz. sloj
	Učenje	Test.	Validac.	Učenje	Test.	Validac.				
MLP 17-7-1	1,000	0,946	0,980	0,000	0,013	0,005	BFGS 24	SOS	Exponential	Logistic

Izlazni podatak iz neuronske mreže je prisustvo anemije kod ispitanika, a ulazni podaci u mrežu su mereni podaci za ispitanika. Koeficijent determinacije (koji pokazuje kvalitet rada neuronske mreže) je prikazan u koloni performanse. Pri ciklusu učenja mreže (koji obuhvata 60% merenih podataka) ostvaren je koeficijent determinacije blizu 1, dok je pri ciklusu testiranja mreže (20% merenih podataka) koeficijent determinacije bio nešto niži (0,946), a pri ciklusu validacije mreže (20% merenih podataka) koeficijent determinacije je bio 0,980. Neuronska mreža uči na osnovu merenih vrednosti i podešava svoju strukturu grešeci i ispravljajući greške u strukturi. Podaci o greškama mreže tokom ciklusa učenja, testiranja i validacije prikazani su u datoj tabeli u koloni greške. Funkcija greške pri formiranju matematičkog modela bila je zbir kvadrata razlika (SOS), a algoritam za učenje je bio BFGS 24. Funkcije aktivacije srednjeg (skrivenog) sloja i izlaznog sloja mreže bile su eksponencijalna i logistička, prema redosledu navođenja.

4.4 SIMULACIJA VEŠTAČKIH NEURONSKIH MREŽA

U ovoj tezi predikcija prisustva anemije kod ispitanika ispitivana je na osnovu ulaznih parametara u neuronsku mrežu (uzrast, Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat) i može se izračunati preko jednačine [3.5.3], na osnovu matrica W_1 i B_1 , kao i matrica W_2 i B_2 , koje predstavljaju težinske koeficijente i greške računanja vezane za skriveni sloj, primenom prenosnih funkcija f_1 i f_2 u skrivenom i izlaznom sloju prema redosledu navođenja, na matricu ulaznih promenljivih X . Algebarski sistem jednačina se može jednostavno koristiti u *Microsoft Excel* programu za predviđanje izlaza.

U tabeli 4.4.1 prikazani su članovi matriksa W_1 i vektora B_1 (predstavljani u "bias" koloni), a u tabeli 4.4.2. članovi W_2 i vektora B_2 ("bias" red) skrivenog sloja za ANN model osmotskog rastvora OR_1 .

Tabela 4.4.1. Težinski koeficijenti između ulaznog i srednjeg sloja neuronske mreže.

	Uzrast	Le	Er	Hb	Tr	MCV	MCH	MCHC	Fe	UIBC	TIBC	CRP	Feritin	Transferin	Hepcidin	Rtc %	Tsat %	Bias
1	0,864	-0,157	0,539	0,298	-0,038	0,192	0,542	-0,293	-0,249	-0,209	-0,293	1,167	0,258	-0,075	0,040	0,251	-0,003	0,003
2	0,414	0,515	0,144	-0,280	-0,065	0,865	0,047	0,218	-0,558	1,332	-0,633	-0,523	0,081	-0,088	0,049	-0,067	0,003	0,125
3	1,038	0,024	-0,016	-0,343	0,380	1,262	0,402	0,694	-0,126	-0,290	1,637	0,022	0,020	-0,088	0,012	0,124	0,062	0,223
4	0,578	1,599	-0,001	-0,044	-0,355	-0,389	-0,056	0,208	-0,449	0,764	-0,216	0,334	0,032	0,057	-0,133	0,220	-0,132	0,910
5	-0,874	0,005	-0,042	-0,209	0,206	0,883	0,388	-0,086	0,906	-0,252	-0,932	1,152	-0,045	0,170	0,027	0,074	0,106	2,262
6	0,331	-0,278	-0,270	0,010	-0,003	0,963	-1,044	-0,542	0,539	0,073	0,282	-1,464	-0,025	0,022	0,063	0,096	-0,072	-0,008
7	0,556	0,720	-0,419	-0,302	0,607	0,365	0,352	0,685	0,015	-0,086	-0,273	1,134	-0,068	-0,076	0,093	-0,092	0,047	-0,001

Tabela 4.4.2. Težinski koeficijenti između srednjeg sloja i izlaznog sloja neuronske mreže.

	Anem
1	0,958
2	-0,281
3	0,398
4	-0,341
5	-1,445
6	-0,095
7	0,172
Bias	0,537

Srednja vrednost i standardna devijacija rezidualnih vrednosti izlaza su takođe analizirane. Srednje rezidualne vrednosti za prisustvo anemije kod ispitanika su: 0,004, a standardna devijacija rezidualnih vrednosti iznosila je 0,085. Ovi rezultati su pokazali

dobru aproksimaciju normalne raspodele oko nule, dakle, odnosi standardnih devijacija i srednjih vrednosti su niski, sa verovatnoćom od 95 % ($2 \cdot SD$), što ukazuje da ANN modeli imaju dobru sposobnost generalizacije za opsege eksperimentalnih vrednosti prisustva anemije kod ispitanika.

Poređenjem r^2 vrednosti kod dobijenih linearnim modelom (tabela 4.2.1.) i ANN modela (tabela 4.3.1) za predikciju stanja ispitanika uočava se da su one nešto niže u prvom slučaju. S obzirom na to da se kod ANN eksperimentalni podaci dele (podaci za učenje – 60 %, testiranje – 20 % i validaciju – 20 %), ukupna vrednost r^2 i SOS, odnosno ocena kvaliteta mreže, određuje se kao $0,6 \cdot \text{učenje} + 0,2 \cdot \text{testiranje} + 0,2 \cdot \text{validacija}$, pri čemu je važnija ocena za fazu učenja (najveći deo podataka), a posmatra se i da SOS ima najnižu vrednost. Svakako, dokazano je da se obe vrste modela mogu koristiti za predviđanje izlaza. Ovaj rezultat je u skladu sa zaključcima drugih istraživanja (136,137).

4.5 ANALIZA OSETLJIVOSTI

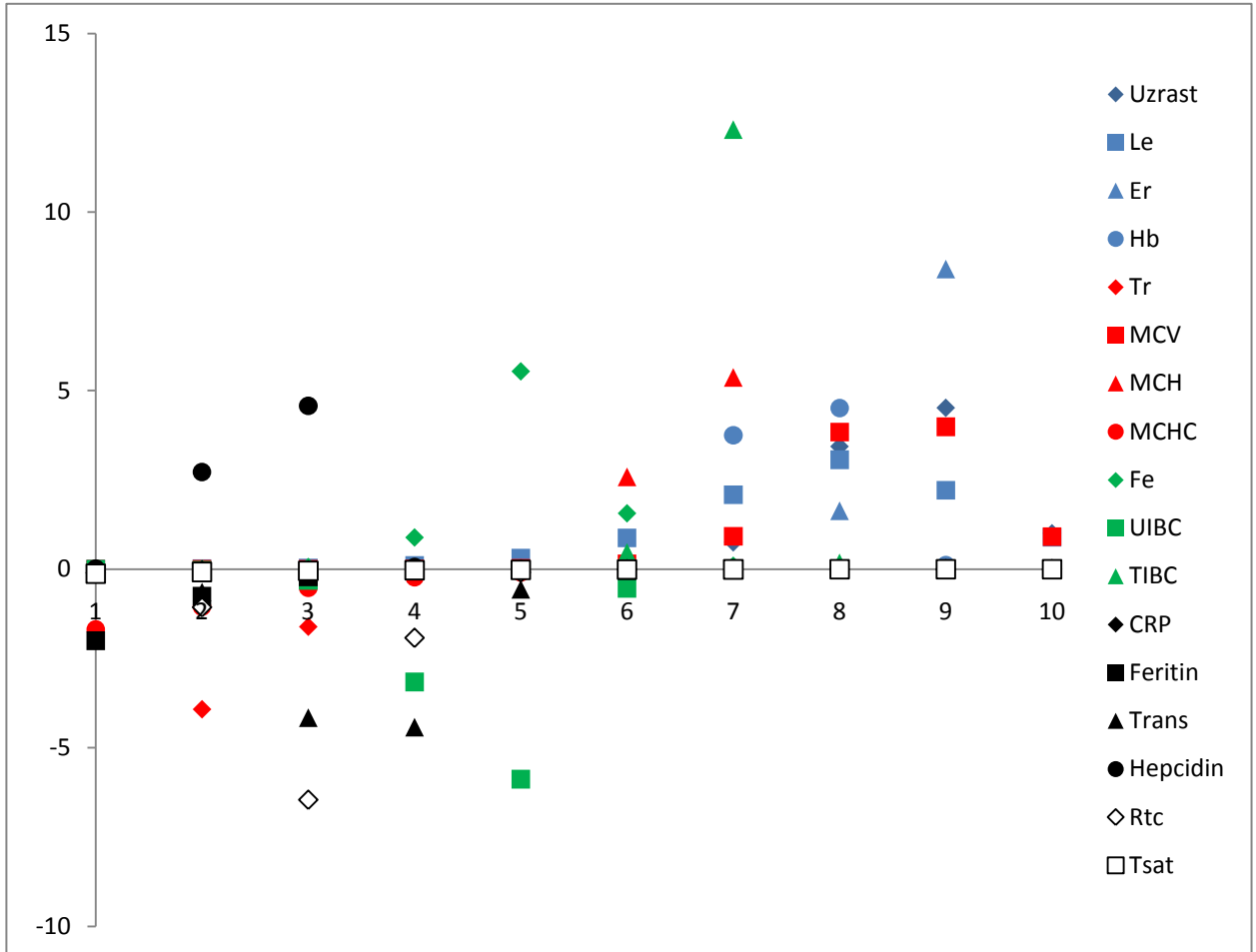
Analiza osetljivosti je primenjena kako bi se ispitali uticaji malih promena ulaznih veličina (procesnih promenljivih) na izlazne veličine procesa. Izlazi koji imaju veću osetljivost imaju veći odziv na male promene ulaznih veličina (139). Analizom osetljivosti se testiraju infinitezimalne promene nominalne ulazne veličine u deset individualnih, jednako udaljenih tačaka ulaznog prostora, od minimalne do maksimalne vrednosti posmatrane ulazne veličine, radi ispitivanja promena izlazne veličine. Ova analiza se takođe koristi i za ispitivanje osetljivosti i grešaka ANN modela.

Uticaj ulaznih promenljivih na izlazne veličine prikazan je na grafikonu 4.5.1. Dobijeni su računanjem promena na izlaznim veličinama, pri infinitezimalnim promenama određenih nominalnih vrednosti ulazne veličine.

Analiza osetljivosti ukazuje na osetljivost odzivnih promenljivih u posmatranom opsegu procesnih promenljivih (računa se polinomom drugog reda). Vrednosti osetljivosti prikazani na grafikonu predstavljaju izvode prvog reda računane u tačkama koje se nalaze na desetinama punog opsega svake procesne promenljive. Tako se svaki izvod ulazne promenljive računa u odnosu na položaj deset jednako udaljenih tačaka na opsegu od minimuma do maksimuma za svaku promenljivu (ekstremne vrednosti u tom slučaju koriste se kao krajnje tačke za analizu). Vrednosti prvog izvoda za svaku promenljivu se računaju na osnovu Taylor-ove formule [4.5.1.] (129,141,142):

$$Y_i(x + \Delta x) = Y_i(x) + \sum_{j=1}^m \frac{\partial Y_i}{\partial x_j} \cdot \Delta x_j + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^m \sum_{j=1}^m \frac{\partial^2 Y_i}{\partial x_k \partial x_j} \cdot \Delta x_k \cdot \Delta x_j + \dots \quad [4.5.1.]$$

Dobijene vrednosti prikazuju nivo eksperimentalne greške, ali takođe prikazuju i uticaje ulaza na izlazne promenljive.



Grafikon 4.5.1. Analiza osetljivosti za model neuronske mreže.

Analiza osetljivosti se koristi za detaljno određivanje uticaja promenljivih na prisustvo anemije kod ispitanika. Sa grafikona 4.5.1. se vidi da je uticaj uzrasta izraženiji pri većim vrednostima uzrasta. MCV, broj eritrocita, MCH i koncentracija gvožđa ukazuju na postojanje sideropenijske anemije pri nižim vrednostima ovih parametara. Više vrednosti TIBC ukazuju na postojanje anemije kod ispitanika. Više vrednosti broja trombocita ukazuju na postojanje anemije kod ispitanika. MCHC i CRP nemaju značajniji uticaj na određivanje prisustva sideropenijske anemije kod ispitanika. Visoke vrednosti UIBC ukazuju na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika. Visoke vrednosti transferina ukazuju na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika. Hepcidin ukazuje na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika, ukoliko su njegove vrednosti niske. Viši broj retikulocita ukazuje na postojanje anemije.

Na grafikonu 4.5.1 se vidi da hepcidin ima veoma značajnu ulogu u formiranju modela neuronske mreže, kao i na određivanje prisustva sideropenijske anemije ispitanika. Hpcidin je u odnosu na hemoglobin daleko bolji indikator u određivanju postojanja sideropenijske anemije kod ispitanika, odnosno deficita gvožđa u organizmu i može se smatrati faktorom koji mnogo pre pada vrednosti hemoglobina ukazuje na postojanje deficita gvožđa u organizmu.

5. DISKUSIJA

U našem istraživanju, u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca 23,21% (13) dece je imalo blagu anemiju, 53,57% (30) umerenu i 23,21% (13) dece tešku anemiju (Grafikon 4.1). Ispitivanjem učestalosti anemije u Brazilu kod dece uzrasta 6-36 meseci došlo se do zaključka da 56,9% dece ima blagu, 42,2% umerenu i 0,9% dece tešku anemiju (143). Ispitivanjem anemija u Nepal u uzrasnoj grupi 6-59 meseci pokazano je da 28,7% dece ima blagu, 20% umerenu i 0,4% dece ima tešku anemiju (144), dok u Indiji 26,2% dece ima blagu, 40,4% umerenu i 2,9% dece ima tešku anemiju. Na osnovu iznetih podataka zapaža se da deca koja su bila uključena u naše istraživanje imaju u većem procentu umerenu i tešku anemiju. Prema literaturnim navodima deca uzrastu od 1 do 2 godine imaju 9,3 puta veći rizik od pojave anemije u odnosu na decu uzrastu od 4 do 5 godina (145). Ova vulnerabilnost je povezana sa većom brzinom rasta, pri čemu se telesna masa utrostručava, a telesna površina udvostručava (143). Takođe, nakon druge godine života je povećan unos mesa i drugih namirnica koje sadrže gvožđe. Dečaci su više pogođeni sideropenijskom anemijom od devojčica, što može biti posledica bržeg rasta i većih telesnih potreba za gvoždem koje ne mogu biti zadovoljeno apsorpcijom gvožđa iz hrane (143,145). I u našem ispitivanju u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca je bilo više ispitanika muškog pola. U uzrasnoj grupi od 11 do 19 godina, 11,5% (3) ispitanika ženskog pola je imalo blagu anemiju, 65,38% (17) umerenu i 23,07% (6) tešku anemiju (Grafikon 4.2), dok je 4 ispitanika muškog pola imalo blagu, a 3 umerenu anemiju.

Osim standardnih parametara hematopoeze, u ispitivanoj i kontrolnoj grupi, analizirali smo različite parametre metabolizma gvožđa (Tabela 4.1.1 a i b).

Analizom broja leukocita uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti broja leukocita između grupe ispitanika obolelih od anemije i kontrolne grupe za isti uzrast, ali je uočeno da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti broja leukocita za posmatrane dve uzrasne grup. Faktor uzrasta grupe najviše utiče na vrednost parametara broja leukocita ($p < 0,01$), dok nelinearni član uzrast \times anemija ima izvestan uticaj ($p < 0,10$). Ovo se može objasniti većom učestalošću infekcija u mlađem uzrastu i povećanoj aktivnosti kostne srži (23).

Određivanjem vrednosti eritrocita nije uočena statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe za dati uzrast, kao ni između dve posmatrane uzrasne grupe. Zapaženo je da faktor anemija grupe najviše utiče na vrednost parametara eritrocita ($p < 0,05$). Kod osoba koje boluju od sideropenijske anemije broj eritrocita je normalan ili

neznatno povišen kao posledica povišene endogene eritropoetinske aktivnosti u odgovoru na hipoksiju (23).

Analizom vrednosti hemoglobina utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti hemoglobina između ispitivane i kontrolne grupe za dati uzrast, kao i da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti hemoglobina za posmatrane dve uzrasne grupe. Utvrđeno je da faktor anemija grupe najviše utiče na vrednost parametra hemoglobina ($p < 0,01$), dok faktor uzrasta takođe ima veliki značaj na vrednost parametra hemoglobina ($p < 0,01$). Međutim, dobijene vrednosti u ispitivanim uzrasnim grupama su u skladu sa referentnim vrednostima. Iako određivanje vrednosti hemoglobina predstavlja univerzalno sredstvo za dijagnostikovanje anemije, nedostaje dobra senzitivnost i specifičnost za procenu sideropenijske anemije (16). Koncentracija hemoglobina u fiziološkim granicama ne isključuje deficit gvožđa, jer vrednosti telesnog gvožđa mogu biti značajno snižene pre nego koncentracija hemoglobina padne ispod granične (*cut off*) vrednosti koja definiše anemiju (75).

Određivanjem vrednosti trombocita zapaženo je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti trombocita između ispitivane i kontrolne grupe za dati uzrast, kao i između dve posmatrane uzrasne grupe. Broj trombocita je viši u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca, međutim, u obe uzrasne grupe srednje vrednosti trombocita su u granicama referentnih vrednosti. Zapaženo je da faktor uzrasta grupe najviše utiče na vrednost parametra broja trombocita ($p < 0,01$), dok faktor anemije takođe ima statistički značaj ($p < 0,01$). Značajno više vrednosti u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca se mogu objasniti češćom pojavom infekcija u tom periodu života i većom stimulacijom trombocitne loze. U deficitu gvožđa broj trombocita je često povišen što se pripisuje povećanoj aktivnosti kostne srži, a smatra se da endogena hiperprodukcija eritropoetina stimuliše i megakariocite (23).

U našem istraživanju analizom MCV i MCH pokazano je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti između ispitivane i kontrolne grupe za dati uzrast, kao i između posmatrane dve uzrasne grupe ($p < 0,05$). Takođe, potvrđena je statistički značajna razlika između srednjih vrednosti MCHC između ispitivane i kontrolne grupe za dati uzrast ($p < 0,05$), dok između dve posmatrane uzrasne grupe ne postoji statistički značajna razlika. U obe uzrasne grupe vrednosti eritrocitnih indeksa su bile u granicama referentnih vrednosti. Korpuskularne determinante eritrocita ukazuju na tip anemije usmeravajući dalji dijagnostički postupak. U deficitu gvožđa MCV i MCH se

smanjuju pre MCHC. MCV ima najveću dijagnostičku vrednost u diferencijalnoj dijagnozi anemija (23).

Određivanjem vrednosti gvožđa zapaženo je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti gvožđa za posmatrane dve uzrasne grupe, za kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok ne postoji statistički značajna razlika između grupa ispitanika kod kojih je postavljena dijagnoza anemije, za ove dve uzrasne grupe. Faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara gvožđa ($p < 0,01$). Koncentracija gvožđa u plazmi nije strogo kontrolisana i značajno se menja u fiziološkim uslovima. Promene nekada nastupaju vrlo brzo i odraz su prelaska gvožđa iz skladišta u plazmu i obrnuto, a ne označavaju promene količine gvožđa u organizmu (23).

Između srednjih vrednosti UIBC za posmatrane dve uzrasne grupe u kontrolnom uzorku uočeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$), dok između ispitanika obolelih od anemije, između ove dve uzrasne grupe ne postoji statistički značajna razlika. Faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara UIBC ($p < 0,01$), dok faktor uzrasta takođe utiče na vrednost parametara UIBC ($p < 0,05$). Određivanjem vrednosti parametara TIBC uočena je statistički značajna razlika između srednjih vrednosti parametara TIBC za posmatrane dve uzrasne grupe, u kontrolnom uzorku, dok statistički značajna razlika između dve uzrasne grupe za ispitanike obolele od anemije ne postoji. Faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametara TIBC ($p < 0,01$), dok faktor uzrasta takođe statistički značajno utiče ($p < 0,05$).

Svi ispitanici su prema vrednostima CRP bili bez znakova akutne inflamacije, samim tim nije uočena statistički značajna razlika između srednjih vrednosti CRP za posmatrane dve uzrasne grupe.

U našem ispitivanju potvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti feritina za posmatrane dve uzrasne grupe, ali postoji statistički značajna razlika između ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe ($p < 0,05$). Takođe, pokazano je da faktor statusa anemije najviše utiče na vrednost parametra feritina ($p < 0,01$), što ga čini dobrim testom u postavljanju dijagnoze anemije. S obzirom da feritin predstavlja protein akutne faze inflamatorne reakcije i da su njegove vrednosti povećane u toku infekcije i inflamacije, normalne vrednosti ne isključuju postojanje sideropenijske anemije. Zbog toga je vrednost feritina potrebno korelirati sa drugim markerima inflamacije (15,88).

Analizom parametra transferina zapaženo je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti transferina za posmatrane dve uzrasne grupe, u kontrolnom

uzorku ($p < 0,05$), dok nije uočena statistički značajna razlika između ispitanika obolelih od anemije, između ove dve uzrasne grupe.

U našem istraživanju pokazano je da postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti procenta saturacije transferina za posmatrane dve uzrasne grupe za kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok nije uočena statistički značajna razlika između srednjih vrednosti za ispitanike koji boluju od anemije između dve uzrasne grupe. Faktor statusa anemije grupe najviše utiče na vrednost parametra saturacije transferina ($p < 0,01$), dok faktor uzrasta takođe utiče na vrednost parametra saturacije transferina ($p < 0,01$). Nelinearni član uzrast \times anemija ima izvestan uticaj ($p < 0,05$). Dok je serumski feritin pouzdan pokazatelj nivoa telesnog gvožđa, procenat saturacije transferina je indirektni pokazatelj iskoristljivosti gvožđa u procesu eritropoeze (72). Procenat saturacije transferina ispod 16% ukazuje na suboptimalno snabdevanje kostne srži gvožđem. Snižen procenat saturacije transferina ima relativno visoku senzitivnost (90%) i relativno nisku specifičnost (40-50%) u detekciji deficita gvožđa, ali i pored toga ima široku primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi (71).

Analizom vrednosti broja retikulocita pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti broja retikulocita za posmatrane dve uzrasne grupe, dok statistički značajna razlika između grupe ispitanika koji boluju od anemije i kontrolne grupe postoji ($p < 0,05$). Procena retikulocitnog odgovora je značajna u evaluaciji anemije, pomaže u razlikovanju poremećaja procesa eritropoeze od povećane eritrocitne destrukcije. Procenat retikulocita ispod 2% ukazuje na sideropenijsku anemiju (48).

Osim standardnih parametara metabolizma gvožđa koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi, određivali smo i vrednost serumskog hepcidina (Tabela 4.1.1 b). Hecidin predstavlja senzitivni indikator deficita gvožđa, čak i u odsustvu anemije (111). Od otkrića hepcidina različite grupe istraživača su pokušale da razviju pouzdane testove za određivanje ovog peptida u biološkim tečnostima kako kod ljudi tako i kod eksperimentalnih životinja (84). Određene osobine hepcidina su ga učinile lošim kandidatom za tradicionalne imunohemijske metode bazirane na specifičnim anti-hepcidin antitelima. Mala molekula hepcidina ima četiri disulfidne veze između osam cisteinskih rezidua. To određuje prisustvo samo nekoliko antigenih epitopa, što zajedno sa visokim stepenom konzervacije sekvenci između vrsta čini poteškoće u izazivanju adekvatnog imunog odgovora u telu domaćina. Takođe, hepcidin ima tendenciju stvaranja agregata i prijanjanje za zidove plastičnih epruveta, što zahteva pažljivo rukovanje i standardizaciju preanalitičke procedure (57,95). Do danas je razvijeno nekoliko različitih metoda za

određivanje vrednosti hepcidina u serumu i urinu. Prvi test se zasnivao na masenoj spektrometriji, ali nije našao primenu u rutinskoj kliničkoj praksi. Osim toga u primeni je RIA (Radio-immuno assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) i ligand vezujući test (97). Širok dijapazon vrednosti hepcidina je dobijen upotrebom ovih testova. Razlozi ovakvih diskrepanci nisu poznati, ali se kao mogući razlozi navode ukrštena reaktivnost sa metabolitima hepcidina, hepcidin vezujući faktori u serumu i nedostatak standardizacije testova (146). Danas je dostupno samo nekoliko komercijalnih kitova za određivanje hepcidina-25 u serumu. Ispitivanja koja su vršena u adultnoj populaciji pokazala su različite vrednosti hepcidina prema polu i starosti, međutim, rezultati nisu konzistentni. Takođe, mali broj studija u kojima je određivana vrednost hepcidina kod dece nije dao referentne vrednosti, niti korelaciju hepcidina sa polom, uzrastom, kao ni feremijom u različitim kliničkim stanjima (100). U opštoj populaciji, nivo hepcidina je značajno niži kod žena ispod 50 godina starosti u odnosu na muškarce iste starosne grupe, dok je nakon pedesete godine života sličan u oba pola i relativno konstantnih vrednosti tokom narednih decenija. Razlog tome su povećane potrebe za gvožđem kod žena tokom reproduktivnog perioda (89). U našoj studiji vrednost serumskog hepcidina je određivana ELISA metodom. Dobijena srednja vrednost hepcidina u uzrasnoj grupi od 6 do 24 meseca kod ispitanika koji su bolovali od anemije je iznosila 4,4 ng/ml, a u kontrolnoj grupi 14 ng/ml. U uzrasnoj grupi od 11 do 19 godina, u grupi ispitanika koji su bolovali od anemije srednja vrednost hepcidina je iznosila 4,1 ng/ml, a u kontrolnoj grupi 10 ng/ml. Nije uočena statistički značajna razlika između srednjih vrednosti hepcidina za posmatrane dve uzrasne grupe, ali je uočena statistički značajna razlika između vrednosti hepcidina ispitanika obolelih od anemije i onih iz kontrolne grupe ($p < 0,05$). Potvrđeno je da je faktor statusa anemije grupe najviše uticao na vrednost parametara hepcidina ($p < 0,01$). Prema literaturnim podacima na osnovu dosadašnjih merenja ELISA testom utvrđen je širok opseg vrednosti hepcidina koji se kod zdravih muškaraca kretao od 29 do 254 ng/ml, a kod zdravih žena od 17 do 286 ng/ml (67). *Ganz* navodi opseg vrednosti serumskog hepcidina kod muškaraca od 29 do 254 ng/ml, a kod žena od 16 do 288 mg/ml (111). Ispitivanje *Galesloot* i saradnika koje je obuhvatilo 2998 zdravih dobrovoljaca utvrdilo je da je srednja vrednost serumskog hepcidina kod žena u premenopauzi 4,1 nmol/L i 7,8 nmol/L kod muškaraca (95).

Dogan A. i saradnici su određivali vrednost hepcidina kod dece uzrasta 7-67 meseci koji su bolovali od sideropenijske anemije i dece uzrasta 8-68 meseci koji nisu bolovali od sideropenijske anemije i koji su predstavljali kontrolnu grupu. Prosečna vrednost hepcidina

kod dece koja su bolovala od sideropenijske anemije je iznosila 56,73 ng/ml (38,4-140 ng/ml), a tri meseca nakon primene supstitucione terapije preparatom gvožđa, prosečna vrednost hepcidina je povećana na 64,56 ng/ml (44,31-133,81 ng/ml). Potvrđena je statistički značajna razlika u prosečnoj vrednosti hepcidina pre i nakon lečenja. Prosečna vrednost hepcidina u kontrolnoj grupi je iznosila 50,97 ng/ml (34,8-119,9 ng/ml). Vrednost hepcidina kod dece koja su bolovala od sideropenijske anemije, a nakon lečenja, je bila značajno viša u poređenju sa kontrolnom grupom, i ta razlika je bila statistički značajna. Dobijeni podaci sugerišu da terapija preparatom gvožđa predstavlja značaj faktor u sintezi hepcidina i da je taj uticaj relativno brz. Takođe, potvrđena je statistički značajna korelacija između vrednosti serumskog hepcidina i feritina u grupi dece pre primene terapije preparatom gvožđa. U studiji *Semercioglu* i saradnika, potvrđen je značajno niži nivo hepcidina kod dece uzrasta 1-3 godine koja su bolovala od sideropenijske anemije, u poređenju sa kontrolnom grupom (105). I u ostalim studijama je potvrđena niža vrednost hepcidina kod obolelih od sideropenijske anemije u odnosu na kontrolnu grupu (58). I naši rezultati su u skladu sa literaturnim.

Cangemi je u svojoj studiji takođe određivao vrednost hepcidina kod zdrave dece i one koja su bolovala od sideropenijske anemije. U grupi zdrave dece dobijena je prosečna vrednost hepcidina od 40,8 ng/ml (13,6-68 ng/ml), pri čemu je zapažena značajno viša vrednost kod muškog (prosečno 43,6 ng/ml), nego kod ženskog pola (prosečno 36,4 ng/ml). S obzirom na činjenicu da se koncentracija serumskog hepcidina menja u različitim fiziološkim stanjima, devojčice su bile podeljene u dve grupe. U grupi devojčica koje nisu imale prvu menstruaciju nivo hepcidina je bio viši (prosečno 39,25 ng/ml) u odnosu na grupu devojčica koje su imale prvu menstruaciju (prosečno 36,2 ng/ml), iako ta razlika nije bila statistički značajna. Interesantno je da je nivo hepcidina bio značajno niži kod devojčica koje su imale prvu menstruaciju (prosečno 36,2 ng/ml) nego kod dečaka (prosečno 43,6 ng/ml). Nije potvrđena značajna razlika u vrednosti hepcidina između dečaka i devojčica koje nisu imale prvu menstruaciju (100).

U našem istraživanju korelacijom promenljivih za anemične i zdrave ispitanike (tabela 4.1.18) pokazano je da je parametar hepcidin u pozitivnoj korelaciji sa saturacijom transferina ($p < 0,10$), MCV, koncentracijom gvožđa ($p < 0,05$), koncentracijom feritina ($p < 0,01$), a u negativnoj korelaciji sa koncentracijom transferina ($p < 0,05$) i brojem retikulocita ($p < 0,10$). Sa Biplot grafikona za PCA analizu posmatranih parametara i grupe pacijenata (Grafikon 4.1.17.) se vidi da su parametri transferin, UIBC, TIBC kao i retikulociti u pozitivnoj korelaciji, a njihova korelacija sa parametrima saturacija

transferina, gvožđe i hemoglobin negativna. Takođe se vidi da su korelacije saturacije transferina, gvožđa i hemoglobina pozitivne, kao i da su parametri MCV, MCH i MCHC u pozitivnoj korelaciji. U studiji *Dallalio* i saradnika potvrđena je snažna korelacija između vrednosti serumskog feritina i hepcidina, dok nije bilo značajne korelacije između vrednosti hepcidina i hemoglobina ili serumskog gvožđa (105).

Cangemi je u grupi zdrave dece, nakon podele prema polu i fiziološkom stanju, ispitivao korelaciju hepcidina sa ostalim biomarkerima. Kod muškog pola nije primećena korelacija hepcidina sa ostalim ispitivanim varijablama, dok je u grupi devojčica koje nisu imale prvu menstruaciju zapažena snažna pozitivna korelacija između koncentracije hepcidina i saturacije transferina. U grupi devojčica koje su imale prvu menstruaciju potvrđena je umerena pozitivna korelacija između koncentracije hepcidina i koncentracije transferina. U grupi dece koja su bolovala od sideropenijske anemije, kod devojčica koje nisu imale prvu menstruaciju zapažena je snažna negativna korelacija između koncentracije hepcidina i gvožđa u serumu, koncentracije hepcidina i feritina i koncentracije hepcidina i MCV, a u grupi devojčica koje su imale prvu menstruaciju, snažna negativna korelacija između koncentracije hepcidina i hemoglobina, hematokrita, MCV i koncentracije gvožđa u serumu, kao i umerena korelacija između koncentracije hepcidina i transferina (100). U studiji koju su sproveli *Cherian S.* i saradnici potvrđena je pozitivna korelacija koncentracije hepcidina sa hemoglobinom, MCV, koncentracijom gvožđa i feritina i saturacijom transferina, a negativna korelacija sa koncentracijom transferina (147). Osim u serumu, nivo hepcidina se može određivati i u urinu. Prilikom određivanja nivoa hepcidina u urinu kao ranog prediktora deficita gvožđa kod dece, dokazana je značajna pozitivna korelacija koncentracije hepcidina u urinu sa koncentracijom hemoglobin u serumu, MCV, MCHC, hematokritom, koncentracijom gvožđa i feritina u serumu i saturacijom transferina, kao i značajna negativna korelacija sa koncentracijom transferina u serumu i TIBC (88).

Fluktuacije u nivou hepcidina imaju pozitivnu korelaciju sa nivoom serumskog feritina (29,33,76,110,148), a u nekim studijama je potvrđena i pozitivna korelacija i sa C-reaktivnim proteinom (110). Prema literaturnim navodima, regulacija sinteze hepcidina je dinamičnija u poređenju sa feritinom koji je specifičan za određivanje deponovanog gvožđa i varira sporije u odgovoru na zahteve eritropoeze. Iako hepcidin ima ulogu reaktanta akutne faze inflamatorne reakcije kao i feritin, vrednost hepcidina opada mnogo brže nakon uklanjanja infektivnog ili inflamatornog signala. Prema *Uijterschout* i saradnicima, kod dece koja imaju deficit gvožđa u periodu rekonvalescencije, vrednost

serumskog hepcidina je snižena kako bi se omogućila intestinalna apsorpcija gvožđa za proces eritropoeze, dok je vrednost feritina u ovom periodu uvek iznad graničnih (*cut off*) vrednosti koja je indikativna za deficit gvožđa. Prema tome, hepcidin predstavlja senzitivniji indikator od feritina, međutim, klinička upotreba hepcidina kao indikatora deficita gvožđa je otežana zbog nedostatka definisanih referentnih vrednosti hepcidina za određeni uzrast (99).

Hepcidin je nedetektabilan ili ima niske vrednosti kod ispitanika kod kojih je koncentracija feritina ispod 10 ng/ml, dok su vrednosti povišene u slučaju inflamacije (CRP>10ng/ml) (76). U istraživanju koje su sprovedi *Delaby* i saradnici prosečna vrednost hepcidina kod ispitanika čiji je CRP bio manji od 10 mg/dl je iznosila 4,64 ng/ml, dok je kod ispitanika čiji je CRP bio veći od 10 mg/dl prosečna vrednost hepcidina iznosila 55,85 ng/ml (149). U dijagnostičkom algoritmu, nizak CRP i niska koncentracija hepcidina u serumu ukazuju na deficit gvožđa, visok CRP i visoka koncentracija hepcidina u serumu ukazuju na inflamaciju, dok visok CRP i niska koncentracija hepcidina u serumu ukazuju na deficit gvožđa u inflamaciji (73). S obzirom da predstavlja pozitivan reaktant akutne faze, hepcidin najvišu vrednost dostiže 6 sati nakon delovanja inflamatornog stimulusa, a CRP nakon 24-48 sati (81).

Pomoću linearnog modela i ANN mreže, na osnovu merenih parametara Le, Er, Hb, Tr, MCV, MCH, MCHC, Fe, UIBC, TIBC, CRP, feritin, transferin, hepcidin, Rtc, Tsat, moguće je izvršiti predikciju prisustva anemije kod ispitanika bez obzira na uzrast ili pol ispitanika (Tabele 4.2.2 i 4.3.1.). Neuronska mreža se pokazala kao daleko tačnija metoda za predikciju što odgovara literaturnim podacima (137). Neuronska mreža ima nelinearnu strukturu i pokazalo se da je u stanju da mnogo tačnije predviđa stanje pacijenta, a njen koeficijent determinacije je iznosio 0,999, dok je koeficijent determinacije za linearni model iznosio svega 0,753.

Analiza osetljivosti se koristi za detaljno određivanje uticaja promenljivih na prisustvo anemije kod ispitanika. Sa grafikona 4.5.1. se vidi da je uticaj uzrasta izraženiji pri većim vrednostima uzrasta. Analiza osetljivosti se koristi za detaljno određivanje uticaja promenljivih na prisustvo anemije kod ispitanika. Sa grafikona 4.5.1. se vidi da je uticaj uzrasta izraženiji pri većim vrednostima uzrasta. MCV, broj eritrocita, MCH i koncentracija gvožđa ukazuju na postojanje sideropenijske anemije pri nižim vrednostima ovih parametara. Više vrednosti TIBC ukazuju na postojanje anemije kod ispitanika. Više vrednosti broja trombocita ukazuju na postojanje anemije kod ispitanika. MCHC i CRP nemaju značajniji uticaj na određivanje prisustva sideropenijske anemije kod ispitanika.

Visoke vrednosti UIBC ukazuju na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika. Visoke vrednosti transferina ukazuju na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika. Heparin ukazuje na postojanje sideropenijske anemije kod ispitanika, ukoliko su njegove vrednosti niske. Viši broj retikulocita ukazuje na postojanje anemije.

Na grafikonu 4.5.1 se vidi da heparin ima veoma značajnu ulogu u formiranju modela neuronske mreže, kao i na određivanje prisustva sideropenijske anemije ispitanika. Heparin je u odnosu na hemoglobin daleko bolji indikator u određivanju postojanja sideropenijske anemije kod ispitanika, odnosno deficita gvožđa u organizmu i može se smatrati faktorom koji mnogo pre pada vrednosti hemoglobina ukazuje na postojanje deficita gvožđa u organizmu.

Otkrićem hepcidina postignut je napredak u razumevanju molekularnog mehanizma apsorpcije i metabolizma gvožđa što je omogućilo razvoj novih strategija u borbi protiv deficita gvožđa (38). Određivanje vrednosti ovog biohemijskog markera može imati široku primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Povišena vrednost hepcidina u krvi iz pupčanika može poslužiti kao pouzdan biološki marker u detekciji rane neonatalne sepse (86). Niske vrednosti hepcidina su identifikovane kod novorođenčadi u ranoj fazi razvoja deficita gvožđa, pre promena vrednosti feritina i eritrocitnih konstanti. Takođe, niska vrednost hepcidina predstavlja biohemijski parametar dovoljan za započinjanje supstitucione terapije preparatom gvožđa, bez potrebe za određivanjem drugih biohemijskih ili hematoloških konstanti. Može pomoći i u boljoj identifikaciji pacijenata sa anemijom u hroničnim bolestima. Kod pacijenata sa niskim vrednostima gvožđa i feritina, visoke vrednosti hepcidina mogu pomoći u identifikaciji pacijenata koji su rezistentni na oralnu terapiju preparatima gvožđa i koji, prema tome, zahtevaju parenteralnu primenu (111). S obzirom da predstavlja senzitivniji pokazatelj stanja gvožđa u organizmu, određivanje vrednosti hepcidina može zameniti tradicionalne markere koji se koriste u dijagnostici anemije (150).

6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracija hepcidina je statistički značajno niža ($p < 0,05$) u dece i adolescenata koji boluju od sideropenijske anemije u poređenju sa decom i adolescentima koji ne boluju od sideropenijske anemije.
2. Postoji pozitivna korelacija između koncentracije serumskog hepcidina i koncentracije gvožđa u serumu ($r = 0,166$; $p < 0,05$), koncentracije feritina ($r = 0,322$; $p < 0,01$), srednjeg volumena eritrocita ($r = 0,175$; $p < 0,01$) i saturacije transferina ($r = 0,144$; $p < 0,10$). Utvrđena je negativna korelacija između koncentracije serumskog hepcidina i transferina ($r = -0,171$; $p < 0,01$) i broja retikulocita ($r = -0,134$; $p < 0,05$).
3. Koncentracija transferina i nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa i broj retikulocita su međusobno u pozitivnoj korelaciji ($r = 0,676$, $p < 0,01$; $r = 0,601$, $p < 0,01$ i $r = 0,584$, $p < 0,01$, prema redosledu navođenja), a korelacija koncentracije transferina sa parametrima saturacija transferina, koncentracija gvožđa u serumu i hemoglobina je negativna ($r = -0,616$, $p < 0,01$; $r = -0,623$, $p < 0,01$ i $r = -0,763$, $p < 0,01$, prema redosledu navođenja).
4. Saturacija transferina, koncentracije gvožđa i hemoglobina su međusobno u pozitivnoj korelaciji ($r = 0,736$, $p < 0,01$ i $r = 0,971$, $p < 0,01$, prema redosledu navođenja). Parametar srednji volumen eritrocita je u pozitivnoj korelaciji sa srednjom vrednošću hemoglobina u eritrocitu i srednjom vrednošću koncentracije hemoglobina u eritrocitu ($r = 0,894$, $p < 0,01$ i $r = 0,526$, $p < 0,01$, prema redosledu navođenja).
5. Serumska koncentracija hepcidina je visoko senzitivna i specifičan pokazatelj deficita gvožđa kod dece i adolescenata koji boluju od sideropenijske anemije i predstavlja vredan parametar u diferencijalnoj dijagnostici anemija.

6. Model neuronske mreže sa izrazito visokim koeficijentom determinacije (0,999) predviđa prisustvo sideropenijske anemije kod ispitanika bez obzira na uzrast na osnovu merenih parametara leukociti, eritrociti, hemoglobin, trombociti, srednji volumen eritrocita, srednja vrednost hemoglobina u eritrocitu, srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu, gvožđe, nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa, C-reaktivni protein, feritin, transferin, hepcidin, retikulociti, saturacija transferina.

7. Linearni model za predikciju prisustva anemije kod ispitanika je neprihvatljiv s obzirom na koeficijent determinacije od 0,753.

7. LITERATURA

1. Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hemat* 2007;64:139-58.
2. Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? *Pharmacol Therapeut* 2015;146:35-52.
3. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *BBA-Mol Cell Res* 2012;1823:1434-43.
4. Koury MJ. Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. *Blood Rev* 2014;28:49-66.
5. Spasojević-Kalimanovska V. Biohemijska osnova eritropoeze. U: Dopsaj V, Spasojević-Kalimanovska V, Marisavljević D, Terzić B, Memon L, eds. *Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemija*. Beograd: Farmaceutski fakultet Beograd, 2006: 9-36.
6. Barati A, Shamsipur M, Abdollahi H. Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe. *Biosens Bioelectron* 2015;71:470-5.
7. Zacharia G, Maronge GF, Brazda FW, Boulmay BC. Hemoglobin SO-Arab and α -thalassemia diagnosed in an adult: A case-based review of the hemoglobinopathies. *Am J Med Sci* 2013;346(4):325-7.
8. Butcher JT, Johnson T, Beers J, Columbus L, Isakson BE. Hemoglobin α in the blood vessel wall. *Free Radical Bio Med* 2014;73:136-42.
9. Liu L, Martinez JL, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 2014;21:9-16.
10. Synthesis hemoglobin [Internet]. [cited 2016 Mar 29]; Available from: https://www.google.rs/search?q=synthesis+hemoglobin&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjEyaby1eXLAhXhF5oKHfl_BmkQAUIBigB#imgrc=9Aqe1_3-wFvKM%3A
11. Al-Mekhlafi MH, Surin J, Atiya AS, Ariffin WA, Mahdy AKM, Abdullah HC. Anaemia and iron deficiency anaemia among aboriginal schoolchildren in rural Peninsular Malaysia: an update on a continuing problem. *T Roy Soc Trop Med H* 2008;102:1046-52.

12. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet* 2016;387(10021):907-16.
13. Kolarović J, Čulafić J, Čabarkapa V, Vučković N, Vučković D, Bodroža-Solarov M. The incidence of anemia in the adult working population of Vojvodina. *J Med Biochem* 2014;33(3)278-83.
14. Sadighi J, Mohammad K, Sheikholeslam R, Amirkhani MA, Torabi P, Salehi F et al. Anaemia control: lessons from the flour fortification programme. *Public Health* 2009;123:794-9.
15. Balarajan Y, Ramakrishnan U, Ozaltin E, Shankar AH, Subramanian SV. Anaemia in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2011;378:2123-35.
16. Elalfy MS, Hamdy AM, Maksoud SSA, Megeed RIA. Pattern of milk feeding and family size as risk factors for iron deficiency anemia among poor Egyptian infants 6 to 24 months old. *Nutr Res* 2012;32:93-9.
17. Anand T, Rahi M, Sharma P, Ingle GK. Issues in prevention of iron deficiency anemia in India. *Nutrition* 2014;30:764-70.
18. Miller JL. Iron deficiency anemia: A common and curable disease. *CSH Perspect Med* 2013;3:1-10.
19. Ke C, Lan Z, Hua L, Ying Z, Humina X, Jia S et al. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition* 2015;31:304-9.
20. Bianchi VE. Role of nutrition on anemia in elderly. *Clinical Nutrition ESPEN* 2016;11:1-11.
21. Pettit K, Rowley J, Brown N. Iron deficiency. *Pediatrics and child health* 2011;21(8):339-43.
22. Jonker FAM, Hensbroek MB. Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infections. *J Infection* 2014;69:523-7.
23. Vučelić D, Nenadić P, Peško P, Bjelović M, Stojakov D, Sabljak P et al. Sideropenijska anemija i njen značaj u gastroenterološkoj kliničkoj praksi. *Acta Chir Jugosl* 2007;54:91-105.
24. Raiten DJ. Iron: Current landscape and efforts to address a complex issue in a complex world. *J Pediatr-US* 2015;167(4):3-6.
25. Rattehalli D, Pickard L, Tselepis C, Sharma N, Iqbal TH. Iron deficiency without anemia: Do not wait for the haemoglobin to drop? *Health Policy and Technology* 2013;2:45-58.

26. Sekhar DL, Murray-Kolb LE, Kunselman AR, Paul IM. Identifying factors predicting iron deficiency in United States adolescent using the ferritin and the body iron models. *Clinical Nutrition ESPEN* 2015;10:118-23.
27. Peirano PD, Algarin CR, Chamorro RA, Reyes SC, Duran SA, Garrido MI et al. Sleep alterations and iron deficiency anaemia in infancy. *Sleep Med* 2010;11:637-42.
28. Pasricha SR, McQuilten Z, Westerman M, Keller A, Nemeth E, Ganz T, Wood E. Serum hepcidin as a diagnostic test of iron deficiency in premenopausal female blood donors. *Haematologica* 2011;96(8):1099-105.
29. Berglund S, Lonnerdal B, Westrup B, Domellof M. Effects of iron supplementation on serum hepcidin and serum erythropoietin in low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1553-61.
30. Vagace JM, Pecas A, Groiss J, bento C, Ribeiro ML, Gervasini G. Clinical relevance of erythrocyte ferritin in microcytic anemias. *Clin Chim Acta* 2015;442:1-5.
31. Lynch SR. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Cl Ha* 2005;18(2):333-46.
32. Moreira-Araujo RSR, Araujo MAM, Areas JAG. Fortified food made by the extrusion of a mixture of chickpea, corn and bovine lung controls iron-deficiency anaemia in preschool children. *Food Chem* 2008;107:158-64.
33. Camaschella C. Iron- deficiency anemia. *New Engl J Med* 2015;372:1832-43.
34. Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooge M, Abitbol V, Leblanc S, et al. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Digest Liver Dis* 2013;45:803-9.
35. Bidabadi E, Mashouf M. Association between iron deficiency anemia and first febrile convulsion: A case – control study. *Seizure-Eur J Epilep* 2009;18:347-51.
36. Colugnati FAB, Sigulem DM. Risks of anemia in infants according to dietary iron density and weight gain rate. *Prev Med* 2004;39:713-21.
37. Stoffman N, Brugnara C, Woods ER. An algorithm using reticulocyte hemoglobin content (CHr) measurement in screening adolescents for iron deficiency. *J Adolescent Health* 2005;36:529.1-6.
38. Zimmermann M, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet* 2007;370:511-20.
39. Saini RK, Manoj P, Shetty NP, Srinivasan K, Giridhar P. Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger RNA expression and biochemical indices of iron status. *Nutr Res* 2014;34:630-8.

40. Mupfudze TG, Stoltzfus RJ, Rukobo S, Moulton LH, Humphrey JH, Prendergast AJ. *Brit J Haematol* 2014;164:142-159.
41. Bagni UV, Luiz RR, Veiga GV. Overweight is associated with low hemoglobin levels in adolescent girls. *Obes Res Clin Pract* 2013;7:218-229.
42. Yager JY, Hartfield DS. Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. *Pediatr Neurol* 2002;27:85-92.
43. Tsai SF, Chen SJ, Yen HJ, Hung GY, Tsao PC, Jeng MJ, et al. Iron deficiency anemia in predominantly breastfed young children. *Pediatr Neonatol* 2014;55:466-9.
44. Stomka A, Switonska M, Zekanowska E. Heparin levels are increased in patients with acute ischemic stroke: Preliminary report. *J Stroke Cerebrovasc* 2015;24(7):1570-6.
45. Farajdokht F, Soleimani M, Mehrpouya S, Barati M, Nahavandi A. The role of hepcidin in chronic mild stress-induced depression. *Neurosci Lett* 2015;588:120-4.
46. Shafir T, Angulo-Barroso R, Su J, Jacobson SW, Lozoff B. Iron deficiency anemia in infancy and reach and grasp development. *Infant Behav Dev* 2009;32:366-75.
47. Harris JR. Iron deficiency anaemia: does it really matter. *Pediatrics and child health* 2007;17(4):143-6.
48. Blackman SC, Gonzalez del Rey JA. Hematologic emergencies: Acute anemia. *Clinical pediatric emergency medicine*. 2005;6(3):124-37.
49. Normal erythrocytes [Internet]. [cited 2016 Mar 29]; Available from: <https://www.google.rs/search?q=normal+erythrocytes&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjYyADjObLAhXFDZoKHeBfAlsQAUIBigB#>
50. Kostić G. Dijagnoza i prevencija sideropenijske anemije [Internet]. Niš: Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Klinika za dečije interne bolesti; 2011 [cited 2015 Feb 28]: 55-56 pp. Available from: <http://www.pedijatri.org.rs/pedijatrijskidani/2011/pd2011web.pdf>
51. Schumann K, Ertle T, Szegner B, Else nhans B, Solomons NW. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *J Trace Elem Med Bio* 2007;21:147-68.
52. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Heparin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta* 2011;412:823-830.

53. Vyoral D, Petrak J. Heparin: A direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell B* 2005;37:1768-73.
54. Malyszko J. Heparin assays: Ironing out some details. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1015-6.
55. Miranda M, Olivares M, Brito A, Pizarro F. Reducing iron deficiency anemia in Bolivian school children: Calcium and iron combined versus iron supplementation alone. *Nutrition* 2014;30:771-5.
56. Falzacappa MVV, Muckenthaler MU. Heparin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene* 2005;364:37-44.
57. Castagna A, Campostrini N, Zaninotto F, Girelli D. Heparin assay in serum by SELDI-TOF-MS and other approaches. *J Proteomics* 2010;73:527-536.
58. Koliaraki V, Marinou M, Samiotaki M, Panayotou G, Pantopoulos K, Mamalaki A. Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant heparin expressed in *Pichia pastoris*. *Biochimie* 2008;90:726-35.
59. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *BBA-Mol Basis Dis* 2015;1852:1347-1359.
60. Pra D, Franke SIR, Henriques JAP, Fenech M. Iron and genome stability: An update. *Mutat Res-Fund Mol M* 2012;733(1-2):92-9.
61. Lamy PJ, Durigova A, Jacot W. Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer. *Clin Chim Acta* 2014;434:34-40.
62. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. *BBA-Mol Cell Res* 2012;1426-33.
63. Gong J, Du F, Qian ZM, Luo QQ, Sheng Y, Yung W, et al. Pre-treatment of rats with ad-heparin prevents iron-induced oxidative stress in the brain. *Free Radical Bio Med* 2016;90:126-32.
64. Yun S, Vincelette ND. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. *Crit Rev Oncol Hemat* 2015;95:12-25.
65. Ghosh MK, Zhang DL, Rouault TA. Iron misregulation and neurodegenerative disease in mouse models that lack iron regulatory proteins. *Neurobiol Dis* 2015;81:66-75.
66. Coates TD. Physiology and pathophysiology of iron in hemoglobin-associated diseases. *Free Radical Bio Med* 2014;72:23-40.

67. Tussing-Humphreys L, Pustacioglu C, Nemeth E, Braunschweig C. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease and obesity: Introducing hepcidin. *J Acad Nutr Diet* 2012;112:391-400.
68. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *BBA-Gen Subjects* 2012;1820:188-202.
69. Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Bio* 2012;115-9.
70. Brissot P, Loreal O. Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *J Hepatol* 2016;64:505-15.
71. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. *J Crohns Colitis* 2011;5(5):381-91.
72. Shander A, Goodnough LT, Javidroozi M, Auerbach M, Carson J, Ershler WB et al. Iron deficiency anemia – bridging the knowledge and practice gap. *Transfus Med Rev* 2014;28:156-66.
73. Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation. *Blood Cell Mol Dis* 2010;45:238-45.
74. Johnson EE, Wessling-Resnick M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect* 2012;14:207-16.
75. Szoke D, Panteghini M. Diagnostic value of transferrin. *Clin Chim Acta* 2012;413:1184-1189.
76. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, Stefanidis I. Hepcidin and anemia of hemodialysis. *Journal of nephrology and renal transplantation* 2009;2(3):42-53.
77. Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009;91:1223-8.
78. Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Hepcidin expression in liver cells: evaluation of mRNA levels and transcriptional regulation. *Gene* 2014;546:50-5.
79. Ruchala P, Nemeth E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35(3):155-61.
80. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: Therapeutic implications. *J Hepatol* 2011;54:173-81.

81. Wu TW, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatr* 2013;162:67-71.
82. Alvarez CA, Guzman F, Cardenas C, Marshall SH, Mercado L. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish Shellfish Immun* 2014;41:93-101.
83. Yang CG, Liu SS, Sun B, Wang XL, Wang N, Chen SL. Iron-metabolic function and potential antibacterial role of Hepcidin and its correlated genes (ferroportin 1 and transferrin receptor) in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immun* 2013;34:744-55.
84. Macdougall IC, Malyszko J, Hider RC, Bansal SS. Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1681-9.
85. Zhang J, Yu L, Li M, Sun L. Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection. *Fish Shellfish Immun* 2014;38:127-34.
86. Cizmeci MN, Kara S, Kanburoglu MK, Simavli S, Duvan CI, Tatli MM. Detection of cord blood hepcidin levels as a biomarker for early-onset neonatal sepsis. *Med Hypotheses* 2014;82:310-2.
87. Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Hepcidin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. *Clin Chim Acta* 2010;411:1565-9.
88. Sanad M, Gharib AF. Urinary hepcidin level as an early predictor of iron deficiency in children: A case control study. *Ital J Pediatr* 2011;37:37.
89. Campostrini N, Traglia M, Martinelli N, Corbella M, Cocca M, Manna D, et al. Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: The Val Borbera study. *J Proteomics* 2012;76:28-35.
90. Clark RJ, Tan CC, Preza GC, Nemeth E, Ganz T, Craik DJ. Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol* 2011;18:336-43.
91. Hocquellet A, Senechal C, Garbay B. Importance of the disulfide bridges in the antibacterial activity of human hepcidin. *Peptides* 2012;36:303-7.
92. Attia A, Mohammed T, Aziz UAA. The relationship between serum hepcidin level and hypoxemia in the COPD patients. *Egyptian journal of chest diseases and tuberculosis* 2015;64:57-61.

93. Aihner E, Felder TK, Oberkofler H, Hahne P, Auer S, Soyol S, et al. Glucose acts as a regulator of serum iron by increasing serum hepcidin concentrations. *J Nutr Biochem* 2013;24:112-7.
94. Popović M. Nivo hepcidina kod bolesnika lečenih hroničnim programom hemodijalize. (Disertacija), Srbija, Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, 2015. 151 str.
95. Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F. Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clin Chim Acta* 2013;423:99-104.
96. Boumaiza M, Jaouen M, Deschemin JC, Ezzine A, Khalaf NB, Vaultont S, et al. Expression and purification of a new recombinant camel hepcidin able to promote the degradation of the iron exporter ferroportin1. *Protein Expres Purif* 2015;115:11-18.
97. Jiang F, Yu WJ, Wang XH, Tang YT, Guo L, Jiao XY. Regulation of hepcidin through GDF-15 in cancer-related anemia. *Clin Chim Acta* 2014;428:14-9.
98. Zhang X, Rovin BH. Hepcidin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines. *BBA-Gen Subjects* 2010;1800:1262-7.
99. Uijterschout L, Swinkels DW, Akkermans MD, Zandstra T, Nuijsink M, Hendriks D, et al. The value of soluble transferrin receptor and hepcidin in the assessment of iron status in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014;13(6):639-44.
100. Cangemi G, Pistorio A, Miano M, Gattorno M, Aquila M, Bicocchi MP, et al. Diagnostic potential of hepcidin testing in pediatrics. *Eur J Haematol* 2013;90:323-30.
101. Keel SB, Doty R, Liu L, Nemeth E, Cherian S, Ganz T, et al. Evidence that the expression of transferrin receptor 1 on erythroid marrow cells mediates hepcidin suppression in the liver. *Exp Hematol* 2015;43:469-78.
102. Lemos AR, Ismael LAS, Boato CCM, Borges MTF, Rondo PHC. Hepcidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(5):596-9.
103. Shanmugam NKN, Cherayil BJ. Serum-induced up-regulation of hepcidin expression involves the bone morphogenetic protein signaling pathway. *Biochem Bioph Res Co* 2013;441:383-6.
104. Auerbach M, Goodnough LT, Shander A. Iron: The new advances in therapy. *Best practice research clinical anaesthesiology* 2013;27:131-40.

105. Dogan A, Alioglu B, Dindar N, Dallar Y. Increased serum hepcidin and ghrelin levels in children treated for iron deficiency anemia. *J Clin Lab Anal* 2013;27:81-85.
106. Gibson RS, Bailey KB, Williams S, Loughton L, Costa-Ribeiro HC, Mattos AP, et al. Tissue iron deficiency and adiposity-related inflammation in disadvantaged preschoolers from NE Brazil. *Eur J Clin Nutr* 2014;68:887-891.
107. Means RT. Hepcidin and iron regulation in health and disease. *Am J Med Sci* 2013;345(1):57-60.
108. Chua K, Fung E, Micewicz ED, Ganz T, Nemeth E, Ruchala P. Small cyclic agonists of iron regulatory hormone hepcidin. *Bioorg Med Chem Lett* 2015;25:4961-9.
109. Mu M, An P, Wu Q, Shen X, Shao D, Wang H et al. The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *J Nutr Biochem* 2016;30:53-61.
110. Coyne DW. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. *Kidney Int* 2011;80:240-4.
111. Brugnara C. An immunoassay for human serum hepcidin at last: Ganz klar? *Blood* 2008;112:3922-3.
112. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011;117:218-25.
113. Grebentchikov N, Geurts-Moespot AJ, Kroot JJ, Den Heijer M, Tjalsma H, Swinkels DW, et al. High sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br J Haematol* 2009;146(3):317-25.
114. Rehu M, Punnonen K, Ostland V, et al. Maternal serum hepcidin is low at term and independent of cord blood iron status. *Eur J Haematol* 2010;85:345-52.
115. Muller KF, Lorenz L, Poets CF, Westerman M, Franz AR. Hepcidin concentrations in serum and urine correlate with iron homeostasis in preterm infants. *J Pediatr* 2012;160:949-53.
116. Choi HS, Song SH, Lee JH, Kim HJ, Yang HR. Serum hepcidin levels and iron parameters in children with iron deficiency. *Korean J Hematol* 2012;47:286-92.
117. Brugnara C. Reference values in infancy and childhood, u: Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. 6th edition. Philadelphia: WB Saunders, 2003: 1835-1864.

118. Wold S. Chemometrics and intelligent laboratory systems 1995;30:109.
119. Gemperline PJ. Practical guide to chemometrics. Taylor & Francis group, London 2006.
120. Rančić V. Metode za smanjenje dimenzionalnosti podataka i njihova primena u prirodnim naukama, Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za matematiku i informatiku, Novi Sad, 2013.
121. Thielemans A, Massart DL. The use of component analysis as a display method in the interpretation of analytical chemical, biological, environmental and epidemiological data. *Chimia* 1985;39:236-42.
122. Prior RL, Wu X, Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:4290–302.
123. Sun T, Tanumihardjo SA. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science* 2007;72(9),159–65.
124. Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 2010;2:433–59.
125. Tschegg C, Ntaflos T, Hein I. Thermally triggered two-stage reaction of carbonates and clay during ceramic firing- A case study on Bronze Age Cypriot ceramics. *Applied Clay Science* 2009;43:69-78.
126. Peters T, Iberg R. Mineralogical changes during firing of calcium-rich brick clays, *Ceramic Bulletin* 1978;57:503-9.
127. Petrović M. Osnovi veštačkih neuronskih mreža i značaj njihove primene, *Zbornik radova* 2011;20:47-55.
128. Taylor BJ. Methods and procedures for the verification and validation of artificial neural networks, Springer Science, Business Media, Inc., USA, 2006.
129. Nourani V, Fard MS. Sensitivity analysis of the artificial neural network outputs in simulation of the evaporation process at different climatologic regimes. *Advances in Engineering Software* 2012;47:127-146.
130. Arsenović M, Radojević Z, Stanković S, Lalić Ž, Pezo L. What to expect from heavy clay. *Ceramics International* 2013;39:1667-75.
131. Hornik K, Stinchcombe M, White H. Multi-layer feed forward networks are universal approximation, *Neural Networks* 1989;2:359-66.

132. Grieu S, Traoré A, Polint M, Colprim J. Prediction of parameters characterizing the state of a pollution removal biological process. *Engineering Applications of Artificial Intelligence* 2005;18(5):559-573.
133. Grieu S, Faugeroux O, Traoré A, Claudet B, Bodnar JL. Artificial intelligence tools and inverse methods for estimating the thermal diffusivity of building materials. *Energy and Buildings* 2011;43:543-54.
134. Ćurčić BLj, Pezo LL, Filipović VS, Nićetin MR, Knežević V. Osmotic treatment of fish in two different solutions-artificial neural network model. *Journal of Food Processing and Preservation* 2014, article first published online, doi: 10.1111/jfpp.12275.
135. Fedajev A, Mihajlović V. Neuronske mreže kao metod multivarijacione analize, Studijski istraživački rad, Ekonomski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2009.
136. Demuth H, Beale M. *Neural Network Toolbox: For use with Matlab*, The Math-Works, Inc., Natick, MA, USA, 1992.
137. Kollo T, Von Rosen D. *Advanced Multivariate Statistics with Matrices*, In: Mathematics and its applications, Springer, Netherlands, 2005.
138. Trelea IC, Raoult-Wack AL, Trzstram G. Application of neural network modeling for the control of dewatering and impregnation soaking process (osmotic dehydration). *Food Science and Technology International* 1997;3:459-465.
139. Pezo LL, Ćurčić BLj, Filipović VS, Nićetin MR, Koprivica GB, Mišljenović NM, Lević LJB. Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hemijaska industrija* 2013;67(3):465-75.
140. Basheer LA, Hajmeer M. Artificial neural networks: Fundamentals, computing, design and application. *Journal of Microbiological Methods* 2000;43:3-31.
141. Kleijnen JPC. Design and analysis of simulation experiments. *International Series in Operations Research and Management Science*, Springer, Berlin, 2008.
142. Turanzi T, Tomlin AS. *Analysis of kinetics reaction mechanisms*, Springer/Verlag, Berlin Heidelberg, 2014.
143. Zuffo CRK, Schmidt ST, Taconeli CA, Osorio MM, Almeida CCB. Prevalence and risk factors of anemia in children. *J Pediatr-Brazil* 2016. In Press.
144. Khanal V, Karkee R, Adhikari M, Gavidia T. Moderate-to-severe anaemia among children aged 6-59 months in Nepal: An analysis from Nepal Demographic and health survey, 2011. *Clinical epidemiology and global health* 2015. In Press.

145. Goswami S, Das KK. Socio-economic and demographic determinants of childhood anemia. *J Pediatr-Brazil* 2015;91(5):471-477.
146. Larson DS, Coyne DW. Understanding and exploiting hepcidin as an indicator of anemia due to chronic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 2013;32:11-5.
147. Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemna EH, Swinkels DW, et al. An insight into the relationships between hepcidin, anemia, infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees: A cross-sectional study. *Plos ONE* 3(12):e4030.
148. Suarez-Ortegon MF, Arbelaez A, Mosquera M, Moreno-Navarrete, Aguilar-Plata C, Fernandez-Real JM. Circulating hepcidin is independently associated with systolic blood pressure in apparently healthy individuals. *Arch Med Res* 2015;46:507-13.
149. Delaby C, Vialaret J, Bros P, Gabelle A, Lefebure T, Puy H, et al. Clinical measurement of hepcidin-25 in human serum: Is quantitative mass spectrometry up to the job. *EuPA Open Proteomics* 2014;3:60-7.
150. Frazer DM, Anderson GJ. Hepcidin compared with prohepcidin: an absorbing story. *Am J Clin Nutr* 2009;89:475-6.

8. PRILOG

8.1 PRISTANAK INFORMISANOG ISPITANIKA/RODITELJA

Poštovani roditelji i ispitanici,

U Institutu za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine u toku je ispitivanje novog laboratorijskog testa koji se koristi u dijagnostici malokrvnosti usled nedostatka gvožđa. Test koji se ispituje meri koncentraciju hepcidina u krvi.

Hepcidin je u novije vreme otkriveni hormon koji se luči u jetri i učestvuje u regulaciji količine gvožđa u organizmu. Za sada je utvrđeno da je hepcidin dobar pokazatelj stanja gvožđa u organizmu. Međutim, da bi ušao u rutinsku upotrebu u kliničkoj praksi i postao jedan od uobičajenih testova za ispitivanje metabolizma gvožđa u organizmu, test mora proći kliničku standardizaciju, a rezultati se moraju potvrditi na velikom broju ispitanika oba pola i svih životnih dobi.

Tokom ispitivanja hepcidin će se meriti u dece koja su se u Institut javila zbog malokrvnosti usled nedostatka gvožđa i kod dece koja nisu malokrvna već dolaze zbog nekog drugog razloga. Merenje koncentracije hepcidina vršiće se u uzorcima krvi uzetim malokrvnoj i nemalokrvnoj deci. Krv se ni u kom slučaju neće vaditi isključivo radi potrebe istraživanja. U tu svrhu koristiće se uzorak uzet prilikom vađenja za druga planirana rutinska ispitivanja. Na primer, u cilju dokazivanja nedostatka gvožđa u malokrvne dece se rutinski uzima krv za merenje koncentracije gvožđa, feritina i slično, što je standardna procedura. Nemalokrvnoj deci će hepcidin biti određivan samo u slučaju da postoji potreba za vađenjem krvi iz nekog drugog razloga, na primer, zbog potrebe za ispitivanjem mehanizma zgrušavanja krvi, funkcije jetre, bubrega i slično.

Rezultati ispitivanja će se koristiti u cilju sticanja novih saznanja o količinama hepcidina u serumu malokrvne i nemalokrvne dece i u cilju utvrđivanja njegovog značaja i mogućnosti dijagnostike nedostatka gvožđa.

S obzirom da je Vaše dete upućeno u Institut zbog potrebe za ispitivanjem malokrvnosti ili nekog drugog stanja ili oboljenja, pozivamo Vas da kao roditelj date pristanak da Vaše dete bude uključeno u ovu studiju. Uključivanje u studiju podrazumeva Vaše odobrenje uvida u medicinsku dokumentaciju Vašeg deteta, odgovaranje na pitanja u ponuđenoj anketi koja prati ispitivanje kao i Vašu saglasnost da se iz uzorka krvi koji će svakako biti uzet odredi i vrednost hepcidina.

Učešće u ispitivanju je na dobrovoljnoj osnovi i ono može biti prekinuto u svakom trenutku, pri čemu to ni u najmanjoj meri neće promeniti odnos lekara prema Vama i

Vašem detetu. Svi lični podaci kao i podaci koji se tiču zdravstvenog stanja deteta će biti poverljivi. Za učešće u ovom ispitivanju nije predviđena nikakva materijalna nadoknada.

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije u vezi ovog ispitivanja možete se obratiti dr Jelenu Čulafić na telefon 060 4445612.

Ako ste saglasni da Vaše dete bude jedan od učesnika u ovom ispitivanju, molimo Vas da potpišete ponuđeni formular.

SAGLASNOST RODITELJA

Upoznat/a sam sa ciljem ispitivanja koje će se sprovoditi na Odeljenju za hematologiju i onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine. Ponuđeno mi je da moje dete _____ bude jedan od učesnika u ovom ispitivanju.

Rečeno mi je da je ispitivanje isključivo na dobrovoljnoj osnovi i da može biti prekinuto u svakom trenutku, a da to, ni u najmanjoj meri, neće promeniti odnos lekara prema meni i mom detetu.

Takođe mi je rečeno da će svi lični podaci kao i podaci koji se tiču zdravstvenog stanja mog deteta, ostati poverljivi.

Za učešće u ovom ispitivanju ne očekujem nikakvu materijalnu nadoknadu.

Tokom sprovođenja ispitivanja, za sve dodatne informacije telefonom mogu da kontaktiram dr Jelenu Čulafić na telefon 060 4445612.

Pročitao/la sam i u potpunosti razumeo/la sve informacije koje su navedene u Obaveštenju za roditelje. Dobrovoljno pristajem da se moje dete uključi u ispitivanje i da se dobijeni podaci mogu koristiti.

Potpis deteta

Potpis roditelja

Datum
