



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija Jeli

**REGULACIJA METABOLIZMA GVOŽĐA, NIVO
HEPCIDINA I TRANSFERINSKIH RECEPTORA
KOD PACIJENATA NA HEMODIJALIZI**

-doktorska disertacija-

Mentor: Prof dr Tatjana Cvetkovi

Niš, 2013.

lanovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Vidojko or evi , predsednik

Prof. dr Tatjana Cvetkovi , mentor i lan

Prof. dr Gordana Koci , lan

Prof. dr Ivana Stojanovi , lan

Prof. dr Gordana Grubor Lajši , lan sa PMF u Novom Sadu.

Datum odbrane: _____

Rad posve ujem mojim roditeljima

Najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorki Prof. dr Tatjani Cvetkovi na predloženoj temi, kontinuiranoj nesebičnoj pomoći, uloženom trudu, stručnim savetima, razumevanju i prijateljskoj pomoći.

Zavalnost dugujem i profesorima Vidojku Čoroviću, Gordani Kocić, Ivani Stojanović i Gordani Grubor Lajši na stručnim savetima i korisnim sugestijama pri izradi doktorske teze.

Posebno se zahvaljujem na odeljenju za kliničku biohemiju Vojne bolnice Niš dr Biljani Jovović kao i dipl. ing. tehnologije Nevenki Lečić, specijalistima medicinske biohemije od kojih sam dobila ogromnu pomoć pri obavljanju biohemijskih ispitivanja i korisne savete za metodologiju rada.

Posebno se zahvaljujem mom prijatelju dr sc. med. Goranu Damnjanoviću koji je bio uz mene od mojih prvih radova i pružao mi pomoć uvek kada je to bilo potrebno.

I na kraju, veliko hvala mojoj porodici, Zoranu, Krsmanu, Jasni i Aleksandru na velikom strpljenju, razumevanju, odricanju i bezrezervnoj podršci koju su mi pružili tokom izrade teze.

I Autor

Ime i prezime	Marija Jeli
Datum i mesto rođenja:	12.11.1974. godine, Niš
Sadašnje zapošljenje:	Na elnik odseka za biohemiju i imunohemiju, Odeljenje kliničke biohemijske laboratorije Vojne bolnice u Nišu

II Doktorska disertacija

Naslov:	Regulacija metabolizma gvožđa, nivo hepcidina i transferinskih receptora kod pacijenata na hemodijalizi
Broj stranica:	103
Broj šema/slika:	10
Broj tabela:	33
Broj grafikona:	11
Broj bibliografskih podataka:	187
Ustanova i mesto gde je rad izrađen:	Klinika za nefrologiju i hemodijalizu Kliničkog centra u Nišu Odeljenje kliničke biohemijske laboratorije Vojne bolnice u Nišu Specijalizovana biohemijska laboratorija "Neolab"
Naučna oblast:	Klinička medicina, Klinička biohemija
Mentor:	Prof. dr Tatjana Cvetkovi

III Ocena i odbrana

Datum prijave teme:	28.04.2010.godine
Broj odluke i datum odobrenja teme za izradu doktorske disertacije	04-KM-46/07, 22.07.2010. godine
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	Prof. dr Vidojko Đorđević - predsednik Prof. dr Tatjana Cvetkovi - član Prof. dr Gordana Koci - član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	Prof. dr Vidojko Đorđević - predsednik Prof. dr Tatjana Cvetkovi - mentor i član Prof. dr Gordana Koci - član Prof. dr Ivana Stojanović - član Prof. dr Gordana Grubor Lajšić - član sa PMF u Novom Sadu.
Datum odbrane doktorske disertacije:	

IV Naučni doprinos doktorske disertacije

Jeli M, Cvetkovi T, Vidojko Đorđević V, Damnjanović G, Vlahović P, Koci G, Djindjić N, Jovović B, Antić A. Hepcidin i poremećaji metabolizma gvožđa kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću. Vojnosanit Pregl 2013; 70(4):368-73.
--

Sadržaj

LISTA SKRAŠENICA.....	VIII
LISTA TABELA.....	X
LISTA GRAFIKONA.....	XII
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. HRONIKALNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA (HBI).....	3
2.2. ANEMIJA U HRONIKALNOJ BUBREŽNOJ INSUFICIJENCIJI.....	6
2.2.1. Eritrocitopoeza u HBI	7
2.3. METABOLIZAM GVOŽEVA.....	10
2.3.1. Značaj gvoževa.....	10
2.3.2. Resorpcija gvoževa	12
2.3.3. Promet gvoževa u organizmu.....	14
2.3.4. Metabolizam gvoževa u makrofagima.....	16
2.4. TRANSFERINSKI RECEPTORI (STFR).....	17
2.5. REGULACIJA PROMETA GVOŽEVA NA NIVOU CELIJE.....	19
2.6. ZATVORENI KRUG METABOLIZMA GVOŽEVA.....	20
2.7. HEPCIDIN	21
2.7.1. Lokalizacija hepcidina.....	21
2.7.2. Struktura hepcidina	22
2.7.3. Odnos strukture i delovanja hepcidina.....	25
2.7.4. Delovanje hepcidina	26
2.7.5. Mehanizmi kontrole sinteze hepcidina	28
2.7.6. Uloga hepcidina u anemiji HBI.....	32
2.8. FOLNA KISELINA	34
2.9. VITAMIN B12.....	35
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	37

3.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	38
4. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA	39
4.1. ISPITANICI.....	39
4.2. METODOLOGIJA	40
4.3. MESTO I VREME ISPITIVANJA	42
4.4 STATISTI KA OBRADA PODATAKA	42
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	43
5.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH GRUPA	43
5.2. PARAMETRI ANEMIJSKOG SINDROMA ISPITANIKA	46
5.3. PARAMETRI METABOLIZMA GVOŽ A ISPITANIKA.....	47
5.4. KORELACIJA ZNA AJNIH ANEMIJSKIH PARAMETARA ISPITANIKA	48
5.5. KORELACIJA ZNA AJNIH PARAMETARA METABOLIZMA GVOŽ A ISPITANIKA	49
5.6. KORELACIJA ZNA AJNIH ANEMIJSKIH PARAMETARA I PARAMETARA METABOLIZMA GVOŽ A ISPITANIKA	50
5.7. PREDIKTORI POREME AJA METABOLIZMA GVOŽ A	54
5.8. DIJAGRAMI RASIPANJA ISPITANIKA	61
5.9. SENZITIVNOST I SPECIFI NOST PROSE NIH VREDNOSTI FERITINA, HEPCIDINA I sTFR.....	64
6. DISKUSIJA.....	66
6.1. ANEMIJA KOD PACIJENATA NA HEMODIJALIZI	69
6.2. METABOLIZAM GVOŽ A KOD PACIJENATA NA HEMODIJALIZI	71
6.3. HEPCIDIN I ZNA AJ ODRE IVANJA KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI	76
6.4. TRANSFERINSKI RECEPTORI I ZNA AJ ODRE IVANJA KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI	79
7. ZAKLJU CI.....	83
8. LITERATURA	85

Lista skraćenica

HBI	-hronična bubrežna insuficijencija
EPO	-eritropoetin
rHuEPO	- humani rekombinovani eritropoetin
DOQI	- National Kidney Foundation Dialysis Outcomes
JGF	- jagnična glomerulske filtracije
NKF-KDOQI	- National Kidney Foundation Kidney Outcomes Quality Initiative
KDIGO	-"The Kidney Disease: Improving Global Outcomes
(IL)-1	- interleukin 1
G-CSG	-granulocitni stimulirajući faktor
SCF	- faktor stem ćelija
BFU	- burst- forming unit
CFU	- colony- forming unit
Hgb	- hemoglobin
HIF- 1	- hipoksijom indukovani faktor
DMT-1	- divalent metal transporter-1
HCP1	- heme carrier protein 1
IMP	- integrin-mobil ferin put
Fpn1	- Ferroportin1
NRAMP-1	- natural resistance-associated macrophages protein 1
Tf	-transferin
TfR	-transferinski receptor
IRP	- iron regulatory proteins
LEAP-1	- Liver-Expressed Antimicrobial Peptide
Phe	-fenilalanin
HFE	-hemohromatozni protein
HJV	-hemojuvelin
BMP	- bone morphogenetic protein
CRP	-C reaktivni protein
Le	-broj leukocita

Er	-broj eritrocita
HCT	-hematokrit
MCV	-srednja zapremina eritrocita
MCH	-koncentracija hemoglobina po jedinici zapremine eritrocit
MCHC	-srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu
UIBC	-nezasi eni kapacitet za vezivanje gvož a
TIBC	-ukupni kapacitet za vezivanje gvož a
%sat	– procenat saturacije transferina
sTfr	- Koncentracija solubilnih transferinskih receptora
NHANES	- National Health and Nutrition Examination Survey
PROMPT	- protein mapping and comparison tool
⁵¹ Cr-EDTA	- chromium-51 labeled ethylenediamine tetraacetic acid
ROC	- Receive Operating Characteristic

Lista tabela

Tabela 1. Stadijumi HBI.....	4
Tabela 2. Raspodela gvoža u telu zdravog muškarca telesne mase 70 kg.....	12
Tabela 3. Bioaktivnost hepcidinskih derivata.....	26
Tabela 4. Osnovne demografske karakteristike ispitanika.....	44
Tabela 5. Osnovne biohemijske karakteristike ispitanika.....	44
Tabela 6. Lipidni parametri ispitanika.....	45
Tabela 7. Osnovni hematološki parametri ispitanika.....	46
Tabela 8. Osnovni biohemijski parametri metabolizma gvoža.....	47
Tabela 9. Vrednosti vitamina B12 i folne kiseline.....	47
Tabela 10. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u HD grupi.....	48
Tabela 11. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u pre HD grupi.....	48
Tabela 12. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u kontrolnoj grupi.....	48
Tabela 13. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvoža kod bolesnika na hemodijalizi.....	49
Tabela 14. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvoža kod predijaliznih bolesnika.....	49
Tabela 15. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvoža kod kontrolne grupe.....	50
Tabela 16. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvoža kod HD grupe.....	50
Tabela 17. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvoža kod pre HD grupe.....	50
Tabela 18. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvoža kod kontrolne grupe.....	51
Tabela 19. Parametri metabolizma gvoža u grupi pacijenata sa različitim koncentracijama feritina.....	51
Tabela 20. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi.....	55
Tabela 21. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika.....	55
Tabela 22. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi.....	56

Tabela 23. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi.....	56
Tabela 24. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika.....	57
Tabela 25. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi.....	57
Tabela 26. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi.....	58
Tabela 27. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika.....	58
Tabela 28. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi.....	59
Tabela 29. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi.....	59
Tabela 30. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika.....	60
Tabela 31. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi.....	60
Tabela 32. Površina ispod ROC krive.....	64
Tabela 33. Površina ispod ROC krive.....	65

Lista grafikona

Grafikon broj 1. Prikaz strukture ispitanika prema polu.....	43
Grafikon 2. Povezanost vrednosti koncentracije hepcidina sa vrednostima CRP.....	52
Grafikon 3. Povezanost vrednosti koncetracije sTfR sa vrednostima CRP.....	53
Grafikon 4. Povezanost vrednosti koncentracije hepcidina i albumina.....	54
Grafikon 5. Povezanost vrednosti feritina sa vrednostima hepcidina.....	61
Grafikon 6. Povezanost vrednosti feritina sa vrednostima % saturacije.....	62
Grafikon 7. Povezanost vrednosti hepcidina sa vrednostima % saturacije.....	62
Grafikon 8. Povezanost vrednosti koncentracije sTfR i hepcidina.....	63
Grafikon 9. Povezanost vrednosti Fe sa vrednostima % saturacije.....	63
Grafikon 10. ROC kriva hepcidina, feritina i sTFR u ukupnoj populaciji.....	64
Grafikon 11. ROC kriva hepcidina, feritina i sTFR kod pacijenata na dijalizi.....	65

1. UVOD

Hroni ne bubrežne bolesti predstavljaju značajan deo morbiditeta i mortaliteta u različitim zemljama. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) 9,6% odraslih osoba ima neki stepen bubrežne insuficijencije (Coresh i sar., 2005), dok studije iz Evrope, Australije i Azije potvrđuju njenu visoku prevalencu (de Zeeuw i sar., 2005).

Broj bolesnika sa terminalnim stadijumom hroni ne bubrežne insuficijencije (HBI) je u stalnom porastu i globalna je procena da je u svetu u 2007. godini bilo 1,5 miliona pacijenata na tretmanu hemodijalizom (HD) i peritonealnom dijalizom, a preko 400.000 sa transplantiranim bubregom. Od toga je četvrtina lečena u SAD-u, druga četvrtina u Evropi, 20% u Japanu, a 30% u svim ostalim područjima zajedno. Projekcije lečenja dijalizom i transplantacijom za SAD za 2015. godinu su 700.000 lečenih (U.S. Renal Data Systems, 2007).

Renalna anemija je česta komplikacija hroni ne bolesti bubrega, koja pogađa oko 500 miliona ljudi širom sveta i očekuje se da će se njena prevalenca dramatično povećati tokom sledećih decenija zbog povećanja broja stanja koja dovode do hroni ne bolesti bubrega, kao što su dijabetes i hipertenzija (International Federation of Kidney Foundations, 2006; Collins, 2003; U.S. Renal Data System, 2006). Kako bubrežna funkcija slabi sa napredovanjem hroni ne bolesti bubrega, renalna anemija postaje sve izraženija, smanjujući i snabdevanje tkiva i organa kiseonikom. Ukoliko se ne leči, bitno smanjuje kvalitet života i može da dovede do ozbiljnih kardiovaskularnih komplikacija, koje su glavni uzrok smrti kod bolesnika sa hroni nom bubrežnom insuficijencijom

(Collins i Ellefson, 2000; Foley i sar., 2000; Murphy i Parfrey, 2000; Silverberg, 2003). Skoro jedna četvrtina bolesnika u ranim stadijumima hroničnog bubrežnog oboljenja ima renalnu anemiju, a prevalenca raste do skoro 75% u kasnijim stadijumima, kada je neophodna dijaliza (McClellan i sar., 2004). Očekuje se da će broj obolelih i troškovi lečenja renalne anemije značajno porasti narednih godina sa povećanjem incidence bolesti kao što je dijabetes, koji je jedan od glavnih uzroka hronične bubrežne insuficijencije (National Anemia Action Council, 2006; Collins, 2003; U.S. Renal Data System, 2006).

Osnovni razlog anemije pacijenata sa hroničnim bubrežnom insuficijencijom je nedovoljna produkcija eritropoetina (EPO) od strane obolelog bubrega. Pojava humanog rekombinovanog EPO (rHuEPO), koji je odobrila U.S. Food and Drug Administration 1989, jedan je od najznačajnijih napredaka u lečenju bubrežnih bolesnika u poslednjoj deceniji. Studije koje prate mortalitet i hospitalizaciju podržavaju kriterijum National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative (DOQI) da hematokrit u opsegu od 33 do 36% obezbeđuje najbolje propratne efekte (Silverberg, 2003).

Da bi se zadovoljile preporuke, nivo gvožđa kod pacijenata sa HBI mora se podešavati, a odgovarajuće zalihe gvožđa trebaju biti na raspolaganju pre početka tretmana EPO. Nadoknada gvožđa je neophodna da bi se obezbedio odgovarajući odgovor na terapiju EPO kod pacijenata sa HBI, zato što zahtevi za gvožđem od strane kostne srži često prevazilaze količinu gvožđa koja je trenutno na raspolaganju za eritropoezu (mereno procentom saturacije transferina) ili skladištenje gvožđa (mereno serumskim feritinom). U većini slučajeva intravenska primena gvožđa je neophodna da bi se postigla i održala odgovarajuća količina gvožđa. Ipak, prekomerna nadoknada gvožđa može biti povezana sa velikim brojem komplikacija, uključujući i hemosiderozu, ubrzanu aterosklerozu, povećanu osetljivost na infekciju i povećanu verovatnoću pojave maligniteta. Pored gvožđa, mora se obezbediti odgovarajuća nadoknada drugih glavnih supstrata i kofaktora za produkciju eritrocita, posebno vitamina B₁₂ i folata.

Zato je određivanje biohemijskih markera vezanih za praćenje efekta terapije gvožđem i eritropoetinom veoma važno. Razumevanje osnovnih molekularnih mehanizama kontrole unosa, transporta i skladištenja gvožđa može olakšati bolje razumevanje osnovnih patofizioloških mehanizama.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Hroni na bubrežna insuficijencija (HBI)

Pod pojmom hroni ne bubrežne insuficijencije podrazumeva se spektar različitih patofizioloških procesa udruženih sa oštećenom bubrežnom funkcijom i progresivnim padom glomerularne filtracije (JGF) (Bargman, 2008). Definicija i klasifikacija hroni ne bubrežne insuficijencije predložena je od strane National Kidney Foundation Kidney Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) 2002. godina i odobrena od strane "The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)", 2004. godina. Hroni na bubrežna insuficijencija se definiše kao:

- oštećenje bubrega koje traje više od 3 meseca, prouzrokovano strukturnim ili funkcionalnim poremećajima bubrega, sa ili bez pada glomerularne filtracije, koje se manifestuje histološkim abnormalnostima ili poremećajima u karakteristikama krvi, urina ili izgledu bubrega

- pad $JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ koje traje više od 3 meseca, sa ili bez oštećenja bubrega.

To je klinički sindrom koji označava progresivno i trajno propadanje nefrona sa posledicima, postepenim gubitkom svih bubrežnih funkcija: ekskretorne, endokrine, metaboličke. Tokom perioda koji varira od nekoliko godina do nekoliko decenija, HBI progredira u terminalnu bubrežnu insuficijenciju.

Pored nove definicije, NKF (National Kidney Foundation, 2001) je dala i novu podelu stadijuma HBI. Prema dosadašnjim shvatanjima evolucija HBI je išla kroz četiri stadijuma, a NKF sada, shodno definiciji, navodi pet stadijuma (Tabela 1).

Tabela 1. Stadijumi HBI

Stadijum	Opis	JGF (ml/min./1.73 m ²)	Metaboli ke posledice
1	Po etno bubrežno ošte enje	90	
2	Bubrežno ošte enje sa blagim smanjenjem JGF (blaga HBI)	60-89	-PTH po inje da raste (JGF 60-80)
3	Bubrežno ošte enje sa umerenim smanjenjem JGF (umerena HBI)	30 - 59	-pad apsorbcije kalcijuma (JGF <50) -malnutricija -po etna hipertrofija LK
4	Bubrežno ošte enje sa teškim smanjenjem JGF (teška HBI)	15 - 29	-po etni porast triglicerida, -po etna anemija, -hiperfosfatemija, -metaboli ka acidoza, -sklonost hiperkalemiji
5	Otkazivanje funkcije bubrega (uremija)	< 15 ili dijaliza	

Do pre dvadesetak godina naj eš e bubrežne bolesti koje su dovodile do terminalnog stadijuma bile su glomerulonefritisi i pijelonefritisi. Danas je etiologija izmenjena, o emu posebno govori multicentri na Evropska studija Locatelli-ja i sar. (2004). Ova studija pokazuje da uglavnom stariji ljudi zapo inju dijalizu (62,1±14,7), da su nešto zastupljenije osobe muškog pola (62,1%) i da je dijabetesna nefropatija prose no zastupljena u 15,6% pacijenata na dijalizi. Prema ve ini registara i epidemioloških studija, dijabetesna nefropatija je najšira i najzastupljenija pojedina na primarna bolest bubrega kod bolesnika na dijalizi. To je osnovna bubrežna bolest koja najbrže dovodi do terminalne uremije i potrebe za dijalizom.

Le enje bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom je doživelo revoluciju nakon što je sredinom 1940-tih godina kreiran prvi arteficialni bubreg i obavljena prva hemodijaliza. Od tog trenutka došlo je do zna ajnog smanjenja morbiditeta i mortaliteta bolesnika zahvaljuju i brojnim tehni kim unapre enjima (upotreba biokompatibilnih dijaliznih membrana, kontrolisana ultrafiltracija, bikarbonatna dijaliza).

Izbor terapijskog postupka zamene bubrežne funkcije zavisi od prirode obolenja koje je dovelo do terminalne bubrežne insuficijencije, raspoloživih sredstava, individualnih osobina bolesnika, uzimaju i u obzir prednosti i mane pojedinih terapijskih

mogu nosti. Danas su na raspolaganju tri terapijska modaliteta zamene bubrežne funkcije: hemodijaliza, peritoneumska dijaliza i transplantacija bubrega.

Hemodijaliza je najčešći oblik aktivnog lečenja terminalne bubrežne insuficijencije u celom svetu. Ona predstavlja tehnološko-tehničku imitaciju rada normalnih bubrega. Međutim, savremena tehnika je još daleko od mogućnosti da u celosti zameni funkcije živog organizma. Stoga je dijaliznim postupkom moguće manje ili više uspešno zameniti ekskretornu (eliminacija krajnjih produkata metabolizma belančevina, lekova) i delimično regulatornu funkciju bubrega (sastav i zapreminu ekstraćelijske tečnosti), dok se endokrini i metabolički funkcija moduliraju i zamenjuju medikamentima (eritropoetin, supstitucija aktivnog vitamina D3).

Hronična bubrežna insuficijencija označava progresivan gubitak bubrežne funkcije u toku nekoliko meseci ili godina. Simptomi oštećenja bubrežne funkcije su nespecifični i u početku uključuju opštu nelagodnost, gubitak apetita i zamor. Često se HBI otkriva kao rezultat kontrolnih ispitivanja pacijenata kod kojih postoji povećan rizik za nastanak bubrežnog oštećenja, kao što su osobe sa arterijskom hipertenzijom ili šećernom bolešću. Ne retko, HBI se otkriva ispitujući i uzroke postojećih srčanih slabosti ili anemijskog sindroma.

Zbog ekskretorne insuficijencije bubrega u organizmu dolazi do nakupljanja produkata metabolizma (vode, elektrolita, razgradnih proizvoda belančevina), što uzrokuje poremećaj sastava telesnih tečnosti. Endokrini insuficijencija se ogleda u smanjenoj sintezi aktivnog oblika vitamina D (1,25 dihidroholekalciferola), eritropoetina, vazodilatatornih prostaglandina. Obzirom da bubrezi imaju važnu ulogu u metabolizmu i izlučivanju nekih biološki važnih supstancija i lekova, metabolički insuficijencija dovodi do nagomilavanja ovih materija u organizmu.

Sa progresijom bubrežnog oštećenja dolazi do poremećaja rada gotovo svih organa i organskih sistema. Nastaju poremećaji metabolizma vode i elektrolita, kardiovaskularni, pulmonalni, endokrinološki, neuromuskularni, gastrointestinalni, hematološki, imunološki i dermatološki poremećaji.

Elektrolitni disbalansi i infekcije koji su bili najčešći uzroci smrti bolesnika na dijalizi u prošlosti potisnuti su, a u prvi plan su izašle kardiovaskularne bolesti (KVB). Bolesnici sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom imaju 10-20 puta veći rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti u odnosu na opštu populaciju. Uestalost koronarne bolesti doseže 40%, dok je hipertrofija leve komore prisutna u gotovo 75% bolesnika na

dijalizi. Izrazito pove an rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti posledica je ve poznatih tradicionalnih faktora rizika poput starije životne dobi, hipertenzije, hiperlipidemije, dijabetesa, pušenja i nedovoljne fizi ke aktivnosti uz sinergisti ko delovanje netradicionalnih faktora rizika (pove anje odnosa kalcijum-fosfor, hiperparatireoidizam, hemodinamsko optere enje, pothranjenost, zapaljenje, hiperhomocisteinemija, izmenjena sinteza azot-monoksida, anemija).

2.2. Anemija u hroni noj bubrežnoj insuficijenciji

Svetska zdravstvena organizacija definiše anemiju kao koncentraciju Hb manju od 13,0 g/dL kod odraslih muškaraca i žena van menstrualnog ciklusa, i manju od 12,0 g/dL kod žena u menstrualnom ciklusu.

Još od 1836. godine kada je prvi put opisana uzro no-posledi na veza izme u obolelih bubrega i anemije (Bright, 1836), smanjen broj eritrocita se smatra jednom od osnovnih karakteristika HBI. Anemija u HBI je hipoproliferativna, normocitna i normohromna i nastaje kada stepen glomerulame filtracije padne ispod 20-30 ml/min (Caro, 1979), bez obzira na etiologiju osnovnog bubrežnog oboljenja. Težina anemije korelira sa stepenom bubrežne insuficijencije.

Uzroci koji dovode do nastanka bubrežne anemije su brojni, a naj eš e podrazumevaju:

- skra en život eritrocita
- hroni ni gubitak krvi
- insuficijentnu eritropoezu

Poluživot eritrocita u bolesnika sa HBI smanjuje se sa progresijom insuficijencije i obi no iznosi jednu polovinu od normale, prose no 66 dana (30-100 dana) (Eschbach i sar., 1967). Eksperimenti su pokazali da se dužina poluživota eritrocita iz uremi ne krvi normalizuje ukoliko se ona transfunduje zdravim recipijentima, i obrnuto, skra uje se poluživot eritrocita iz krvi zdravih donora ukoliko se transfunduju uremi nim bolesnicima (Desforges i Dawson, 1958). Na osnovu toga zaklju eno je da izvesni faktori plazme dovode do preranog razaranja eritrocita. Me u tzv. hemoliti kim faktorima najvažniji su gvanidin i njegovi derivati, a od poliamina, najvažniji inhibitor eritropoeze koji se akumulura kod uremi nih bolesnika je spermin (Radtke i sar., 1980). Ve ina hemoliti kih faktora ne prolazi kroz hemodijalizne membrane, ali se lako odstranjuje peritonealnom

dijalizom ime se objašnjava lakši stepen anemije kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi. Eritrociti uremi nih bolesnika su mnogo osetljiviji na oksidativni, osmotski i mehani ki stres (Rosenmund i sar., 1975). Hemoliza nastaje kao posledica poreme enog prolaska kroz mikrocirkulaciju slezine. Zbog toga su, ranije, bolesnici sa izrazito teškim stepenom anemije bili podvrgavani splenektomiji kako bi se smanjila njihova zavisnost od transfuzija krvi (Asaba i sar., 1977).

Kod bolesnika sa HBI gubitak krvi nastaje kao posledica same tehnike dijalize (zaostajanja krvi u krvnim linijama i dijalizatoru zbog delimi ne ili kompletne koagulacije), uzorkovanje krvi u cilju dijagnosti kih procedura ili krvarenja iz digestivnog trakta. Još pre 30-tak godina je procenjeno da preko dijalizatora i uzorkovanjem krvi za laboratorijske analize bolesnik na HD izgubi 1-4 litara krvi godišnje (Hocken i Marvvah, 1971). Gubitak krvi preko gastrointestinalnog trakta (GIT) nastaje naj eš e kao posledica mukozne hemoragije uzrokovane hemoragi nom dijatezom usled uremije i upotrebe heparina. Gubitku preko GIT-a doprinosi i pove ana incidenca gastroezofagitisa i pepti kih ulkusa me u ovom populacijom bolesnika.

Iako hemoliza i hroni ni gubitak krvi zna ajno doprinose razvoju anemije u HBI, oni obi no nisu tolikog intenziteta da ne bi bili kompenzovani umerenim pove anjem sinteze eritrocita. Bolesnici sa HBI, me utim, nisu u stanju da poveaju eritropoezu kako bi kompenzovali nastalu anemiju.

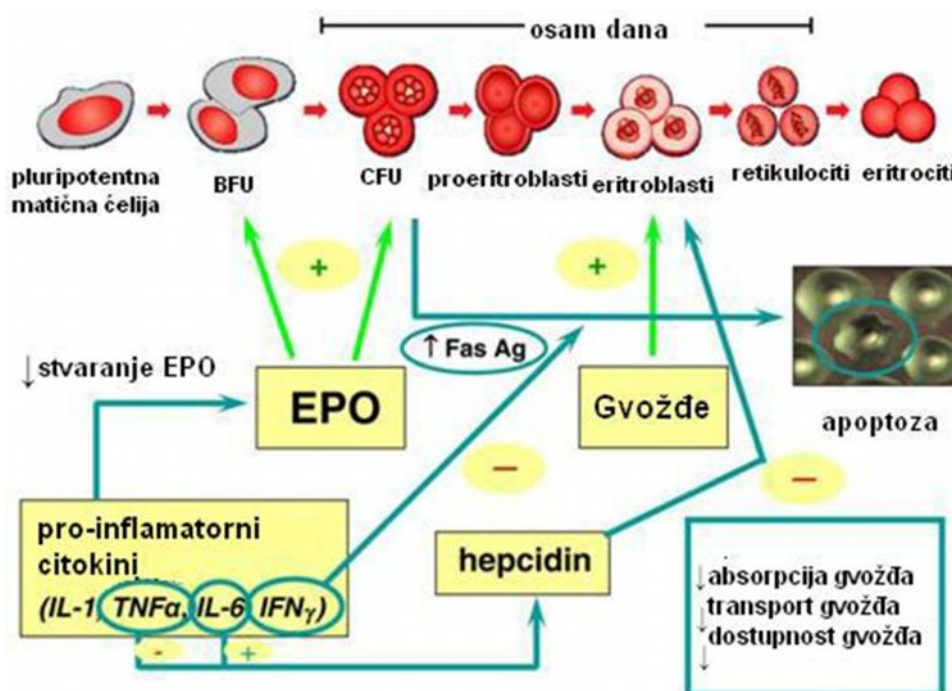
2.2.1. Eritrocitopoeza u HBI

Eritrocitopoeza je proces sazrevanja eritrocita iz njihovih mati nih elija, koje se posle ro enja odigrava samo u kostnoj srži (Slika 1). Eritrociti su visoko specijalizovane elije ija je osnovna funkcija transport disajnih gasova. U fiziološkim uslovima se specifi nim mehanizmima regulacije održava precizna homeostaza izme u saturacije hemoglobina kiseonikom i produkcije eritrocita. Za normalno odvijanje eritropoeze neophodno je postojanje:

- normalnog hematopoeznog tkiva u kostnoj srži,
- dovoljne koli ine gvoža, folne kiseline i vitamina B12,
- specifi nih hematopoeznih faktora rasta.

Pluripotentna matična ćelija hematopoeze je zajednički prekursor eritroidnih i mijelodnih ćelija. Iz ove ćelije nastaju granulociti, monociti, megakariociti i eritrociti.

Većina multipotentnih matičnih ćelija se nalazi u stanju mirovanja, to jest u neproliferativnoj fazi ćelijskog ciklusa (G₀). Hematopoezni faktori rasta ili citokini, kao što su interleukin (IL)-1, granulocitni stimulatorni faktor (G-CSF) i faktor stem ćelija (SCF), aktiviraju multipotentnu matičnu ćeliju te ona prelazi u G₁ fazu ćelijskog ciklusa. Prelaskom u G₁ fazu, ove ćelije postaju osetljive i na druge faktore rasta (IL-3, GM-CSF) (Loose i Patient, 2006; Loose i sar., 2007).



Slika 1. Eritropoeza u HBI

Kod odraslih sisara, eritrocitopoeza započinje kada se pluripotentna matična ćelija diferencijuje u najstariju ćeliju eritrocitne lože (Socolovsky, 2007). To su tzv. "burst-forming unit" eritroidne ćelije (BFU). Daljom diferencijacijom, od njih nastaju "colony-forming unit" eritroidne ćelije (CFU), koje proliferišu u pro-eritroblaste u kojima se vrši ekspresija gena za hemoglobin, i samim tim, sinteza hemoglobina. U sledećoj fazi eritroidnog sazrevanja u eritroblastima, završava se transkripcija gena za hemoglobin (Hb). U retikulocitima koji predstavljaju poslednju fazu u procesu nastanka eritrocita dolazi do degradacije ćelijskog jedra. Zreo eritrocit nema ni jedro ni rezidualnu iRNK za Hb, a ima oko 270×10^6 molekula Hb.

Pošto je zreli eritrocit ćelija bez jedra, nema DNK, i ne može da vrši sintezu belančevina i njihovo obnavljanje, neophodno je da se u toku sazrevanja mladih ćelijskih

oblika eritrocitne loze u njima stvore svi proteini neophodni za funkciju zrelog eritrocita u trajanju od oko 120 dana (hemoglobin, glikoliti ki enzimi i dr.). Zreo eritrocit je zato podložan ubrzanom starenju. S obzirom na njegov kratak poluživot, a visok stepen razgradnje, proces eritropoeze mora odgovoriti adekvatno kako bi se o uvala homeostaza hemoglobina. BFU i CFU elije podležu pre-programiranoj apoptozi u odsustvu specifi nog hormona eritropoetina (EPO). Zato se smatra da je EPO najvažniji hematopoezni faktor rasta, neophodan za preživljavanje, diferencijaciju i proliferaciju BFU i CFU elija (Kurtz, 1987), a nedovoljna sinteza EPO glavni etiološki faktor za nastanak anemije.

Nakon vezivanja za receptor dolazi do endocitoze i razgradnje eritropoetina, a receptor podleže dimerizaciji tj. nastaje homodimer što aktivira membransku tirozin kinazu JAK2 (Powers i sar., 1991). Sledstveno, dolazi do sinteze hemoglobina unutar 12 sati, a sinteza proteina membrane eritrocita i enukleacija javlja se nakon 12-14 sati (Dusanter-Fourt, 1992). To dovodi do ubrzanja eritroidne diferencijacije i stvaranja retikulocita odnosno pove anja mase eritrocita. U odsustvu eritropoetina, eritroidne elije umiru. Dokazano je da EPO usporava cepanje DNK koje se normalno javlja u CFU-elijama (Madan i sar., 1995). Kada se obnovi masa eritrocita, pad koncentracije eritropoetina dovodi do brzog usporenja eritropoeze, jer se ponovo uspostavlja programirana elijska smrt.

Smanjenje parcijalnog pritiska kiseonika (O₂) je primarni fiziološki stimulus za lu enje eritropoetina (Klassen i Spivak, 1990). Kao odgovor na hipoksiju tj. anemiju, pove ava se broj intersticijalnih elija koje sintetišu EPO. Regrutovanje peritubularnih elija koje e sintetisati eritropoetin odvija se na eksponecijalan na in (Koury i sar., 1991). U organizmu ne postoji depo eritropoetina, ve se on sintetiše de novo kao odgovor na hipoksiju. Pove ana koncentracije EPO-a u krvi ne uti e negativno na njegovu sintezu. Klirens eritropoetina takodje ne zavisi od njegove plazmatske koncentracije. Osim toga, koncentracija eritropoetina je konstantna za svaku osobu, na nju ne uti e ni pol ni uzrast.

Hipoksija inicijalno uzrokuje sintezu tzv. "hipoksijom indukovano g faktora" (HIF-1) koji se veže za kiseonik-senzitivni deo gena za EPO i izaziva njegovu transkripciju (Digicaylioglu i sar., 1995). Potreba za kiseonikom i snabdevanje kiseonikom regulišu sintezu eritropoetina mehanizmom povratne sprege u kojoj tkivni pritisak kiseonika ima najvažniju ulogu. Pad tkivnog pritiska kiseonika pove ava sintezu EPO-a.

Pro-inflamatorni citokini smanjuju stvaranje EPO i uzrokuju apoptozu na eritroidnim celijama prekursora (CFU). Rana indukcija apoptoze kod ovih celija zaustavlja proces preobražaja u crvena krvna zrnca. Fas antigen posreduje u ovoj reakciji. Inflamatorni citokini tako e stimulišu stvaranje hepcidina, koji se uklju uje u stvaranje eritrocita, smanjuju i dostupno gvož e za eritroblaste koje je neophodno za sintezu hema hemoglobina. Ovo tako e smanjuje stvaranje eritrocita. Slika 1. pokazuje navedene interakcije.

2.3. Metabolizam gvož a

2.3.1. Zna aj gvož a

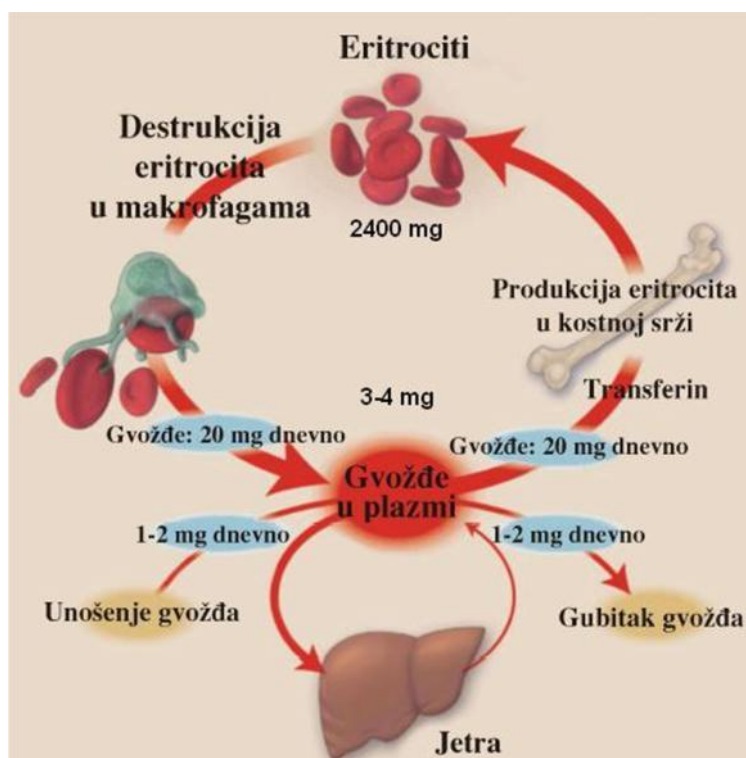
Gvož e je metal široko rasprostranjen u prirodi i biološkim sistemima od velikog zna aja za održanje života, s obzirom na to da je neophodan za transport kiseonika, produkciju energije, adekvatnu eritropoezu, oksidativne procese, kao i elijski posredovan imuni odgovor.

U organizmima, gvož e se najve im delom nalazi u obliku Fe^{2+} i Fe^{3+} jona, mada je laboratorijskim ispitivanjima potvr eno prisustvo gvož a koje može imati više i niže valence. Sposobnost da prima i otpušta elektrone ini gvož e veoma korisnom komponentom molekula koji vezuju kiseonik (hemoglobin ili mioglobin), citohroma, kao i mnogih drugih enzima. Manjak gvož a može dovesti do prestanka rasta elija, pa i elijske smrti, dok pove ani nivo slobodnog gvož a može dovesti do ošte enja elija i tkiva putem generisanja reaktivnih vrsta kiseonika (RVK). Vezivanjem gvož a za razli ite proteinske molekule smanjuje se njegova potencijalna štetnost.

Nivoi gvož a u organizmu moraju precizno da se regulišu u cilju obezbe ivanja fizioloških potreba elija sa jedne strane, a izbegavanja toksi nih efekata sa druge strane. Poreme aji homeostaze gvož a usled nedostatka ili viška ovog metala, dovode do mnogih oboljenja, a kako ne postoji aktivna regulacija ekskrecije gvož a iz organizma, kontrola njegove resorpcije u tankom crevu ima glavnu ulogu u održavanju homeostaze. Normalnom ishranom dnevno se unosi oko 15-20 mg gvož a, od ega se resorbuje 1-2 mg, što zavisi od potreba organizma i gubitaka gvož a deskvamacijom intestinalnih mukoznih elija, epitelnih elija kože, elija urogenitalnog trakta, kao i znojenjem, i preko kose i noktiju (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010).

Odrasla muška osoba normalno sadrži 35-45 mg gvož a po kilogramu telesne mase, dok je kod žena koli ina gvož a nešto niža usled gubitaka tokom menstrualnog krvarenja (Andrews, 1999). Najve i deo gvož a (65%) u organizmu je u sastavu hemoglobina, u mioglobinu skeletnih miši a se nalazi oko 10%, dok je 2-4% gvož a u sastavu enzima i citohroma razli itih tkiva. Preostalo gvož e se skladišti u jetri, makrofagama slezine i koštanoj srži (Slika 2)(Muñoz i sar., 2009).

S obzirom na to da ne postoji aktivni mehanizam regulacije ekskrecije gvož a iz organizma, elije moraju da kontrolišu sve ostale faze njegovog metabolizma: resorpciju, deponovanje i iskoriš avanje. Regulatorni mehanizmi i signali koji uti u na ekspresiju proteina uklju enih u promet gvož a deluju tako što moduliraju procese transkripcije, translacije ili menjaju stabilnost iRNK za ove molekule (posttranslaciona regulacija).



Slika 2. Preraspodela gvož a u organizmu

Raspodela gvož a kod prose nog odraslog muškarca je prikazana u Tabeli 2. Odgovaraju e vrednosti za ženu bi iznosile oko 55% od navedenih.

Tabela 2. Raspodela gvoža u telu zdravog muškarca telesne mase 70 kg.

Protein	Tkivo	Sadržaj gvoža (mg)
Hemoglobin	Eritrociti	2600
Mioglobin	Miši	400
Enzimi (citohromi, katalaza, gvanilat ciklaza itd.)	Jetra i druga tkiva	25
Transferin	Plazma i ekstracelularna tečnost	8
Feritin i hemosiderin	Jetra,	410
	slezina,	48
	koštana srž	300

Normalna dnevna potreba za gvožem je približno 5 mg za muškarce, a 15 mg za dete u doba brzog rasta i za žene sa menstruacijom. Trudna žena ima potrebe za 2-10 puta ve om koli inom od navedene, zbog potreba fetusa i pove anih potreba organizma za vreme trudno e. Organizam zadovoljava potrebe za gvožem isklju ivo putem hrane.

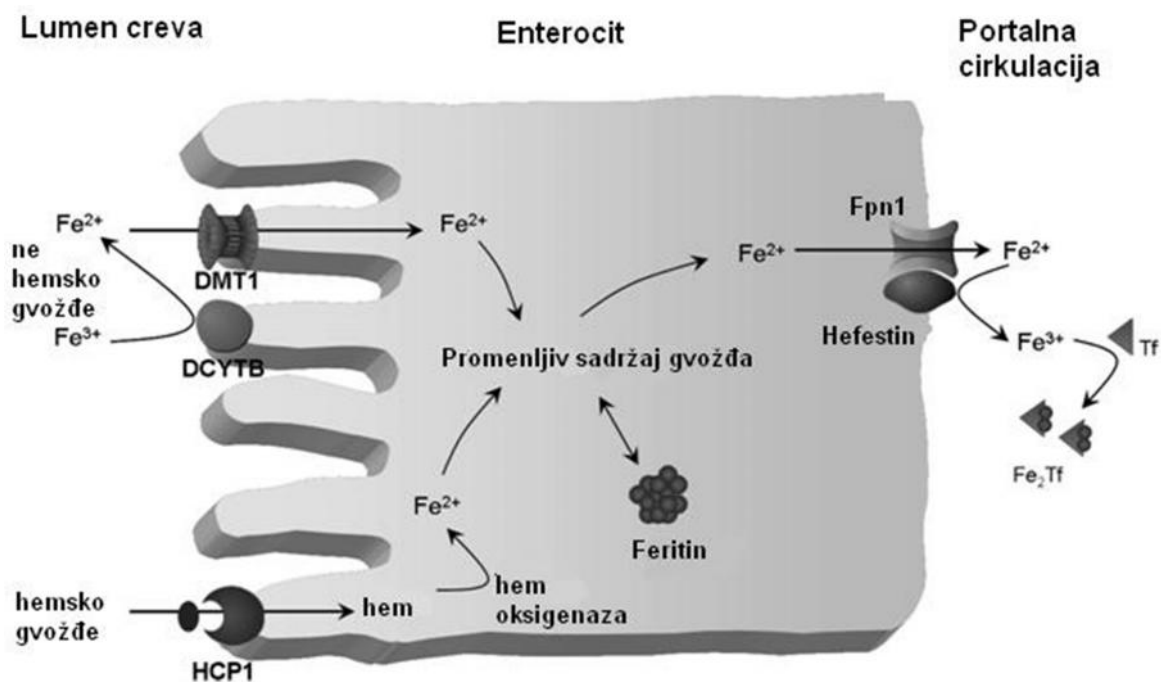
2.3.2. Resorpcija gvoža

Gvož e se resorbuje u proksimalnom delu tankog creva kao Fe^{2+} . Najve im delom (90%) gvož e se u hrani nalazi kao neorgansko (Fe^{3+}), dok preostalih 10% ini organsko gvož e vezano za protoporfirin hema (Fe^{2+}) (Muñoz i sar., 2009). Resorpcija gvoža umnogome zavisi od vrste hrane koja se unosi, koli ine gvoža u organizmu, i najvažnije, od bioraspoloživosti njegovih razli itih formi. U siromašnim delovima sveta kao i kod vegeterijanaca, hrana biljnog porekla (žitarice, zeleno lisnato povr e, pasulj), u kojoj se gvož e nalazi u obliku neorganski soli, osnovni je izvor gvoža. U tom slu aju bioraspoloživost gvoža može biti smanjena istovremenim unosom drugih namirnica, razli itih lekova (tetraciklina, antacida), polifenola (kafa ili aj) i sli no (Bleackley i sar., 2009). U razvijenim zemljama, gde se dosta konzumira meso, gvož e se naj eš e unosi kao organsko i njegova resorpcija ne zavisi od unosa druge hrane. Gvož e se u tankom crevu resorbuje preko epitelnih elija sluzokože, duodenalnih enterocita i generalno postoje dva mehanizma resorpcije gvoža: jedan je za Fe^{2+} u sastavu hema i drugi za Fe^{3+} koji nije u sastavu hema. Gvož e iz hrane, koje nije u sastavu hema i koje je uglavnom Fe^{3+} , pre resorpcije se redukuje pomo u enzima ferireduktaze (duodenalni citohrom b),

lociranog na apikalnoj membrani enterocita. Ovaj enzim koristi askorbat kao donor elektrona (Bleackley i sar., 2009). Gvož e se zatim resorbuje preko nespecifi nog transportera DMT-1 (eng. divalent metal transporter) koji je simporter za H^+ i dvovalentne metale, a nalazi se u apikalnoj membrani enterocita (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010). Njegovo prisustvo je pokazano i u bubrezima i mozgu gde tako e u estvuje u preuzimanju gvož a (Bleackley i sar., 2009). Nespecifi nost ovog transportera se ogleda u tome što se, osim Fe^{2+} , njima transportuju i drugi dvovalentni metali (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) (Slika 3).

Organsko gvož e se u duodenumu resorbuje posredstvom proteinskog nosa a za hem (HCP1-eng. heme carrier protein 1). Smatra se da ovaj transporter zahteva energiju za svoju aktivnost, a nedavno je utvr eno da ima veliku ulogu i u transportu folata kroz elijsku membranu. Resorpcija Fe^{2+} je laka i brza, što ukazuje na potrebu koriš enja crvenog mesa u ishrani. U enterocitima se hem resorbovan iz hrane razlaže uz pomo hemoksigenaze i tako oslobo eno Fe^{2+} se dalje transportuje kao gvož e dobijeno iz neogranskih izvora (Slika 3).

Postoji i tre i, alternativni put resorpcije gvož a (Bleackley i sar., 2009), tzv.integrin-mobil ferin put (IMP), kojim se transportuje neorgansko trovalentno gvož e, a koje se aktivira samo kada postoji deficit ovog metala u organizmu. U citoplazmi enterocita ovako resorbovano gvož e se redukuje u Fe^{2+} posredstvom kompleksa poznatog kao paraferitin, a dalji metabolizam mu je isti kao i neorganskom Fe^{2+} transportovanom uz pomo DMT-1 (Bleackley i sar., 2009).



Slika 3. Molekularni put apsorpcije gvož a preko enterocita duodenuma

2.3.3. Promet gvož a u organizmu

Nakon ulaska u enterocite, gvož e može da ostane u eliji gde se koristi u metaboli kim procesima, da se transportuje kroz bazolateralnu membranu u enterocitu ili da se skladišti vezano za protein apoferitin kao depo oblik feritin. Iz feritina enterocita gvož e ne može da se mobiliše i prebaci u cirkulaciju, ve se starenjem elija i njihovom deskvamacijom u lumen gastrointestinalnog trakta eliminiše iz organizma. Ferroportin (Fpn1) je jedini do danas poznati eksporter gvož a, prisutan u bazolateralnoj membrani duodenuma, ali i na membranama makrofaga i hepatocita (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009). On je, osim za izlazak gvož a iz enterocita u me u elijsku te nost iz koje e pre i u krvne kapilare, odgovoran i za transport gvož a koje se osloba a iz ostarelih eritrocita nakon degradacije hemoglobina, kao i transport gvož a iz maj inog u organizam fetusa.

Aktivnost Fpn1 na bazolateralnoj membrani enterocita je tesno koordinisana sa ferooksidazom hefestinom (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009), koji oksiduje Fe^{2+} u Fe^{3+} . Smatra se da je hefestin ograni avaju i faktor intestinalne resorpcije gvož a i bez njegove aktivnosti gvož e ne bi moglo da se veže za transferin u sistenskoj cirkulaciji. Prisustvo hefestina dokazano je i u elijama debelog creva, mozga, plu a i

placente (Bleackley i sar, 2009). Nakon oksidacije, gvož e se u krvi vezuje za glikoprotein plazme transferin (Tf) (slika 3). Jedan molekul transferina može da veže dva molekula Fe^{3+} tako da postoje tri forme transferina: apotransferin (transferin + 0 Fe^{3+}), Tf-Fe1 (transferin + 1 Fe^{3+}) i Tf-Fe2 (transferin + 2 Fe^{3+}). Transferin je najpoznatiji transporter gvož a do razli itih elija. On održava Fe^{3+} u izvornom obliku, spre ava eliminaciju preko bubrega i jetre i ograni ava u estvovanje Fe^{3+} u generisanju reaktivnih vrsta kiseonika. U fiziološkim uslovima oko 30% plazma transferina je zasi eno gvož em. Kada je nivo zasi enja trasferina gvož em manji od 16% smatra se da postoji nedostatak gvož a u organizmu, dok zasi enost iznad 45% ukazuje na preoptere enje. Kada zasi enje transferina prekora i 60% slobodno gvož e se akumulira u cirkulaciji i oste uje parenhimske elije, posebno hepatocite, putem oksidacionih reakcija (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010).

Gvož e u ciljne elije (prekursore eritrocita ili eritroblaste, hepatocite i elije imunog sistema) ulazi isklju ivo vezano za trasferin putem receptor-posredovane endocitoze. Ove elije na svojoj membrani imaju receptore za transferin (TfR) koji je vezao 2 Fe^{3+} , ali ne i za slobodno gvož e, ili Tf-Fe1.

Gvož e se u elijama koristi za sintezu specifi nih proteina, pre svega hemoglobina, zatim Fe-S proteina u mitohondrijama, citohroma, akonitaze, ribonukleotid-reduktaze, ili se skladišti (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009). Gvož e se prvenstveno skladišti u obliku feritina a, u manjoj meri, kao hemosiderin.

Najve i depoi gvož a u obliku feritina nalaze se u jetri, zatim u slezini i kostnoj srži. Iz ovih depoa ono može da se koristi kada potrebe organizma to zahtevaju. Feritin sadrži apoferitin u ijjoj unutrašnjosti su ferihidroksid, kiseonik i jon vodonika, koji grade kompleks feri-oksihidroksid. Apoferitin je sastavljen od 24 identi na monomera koji formiraju šuplju sferu u kojoj može biti deponovano do 4500 jona Fe^{3+} . Prenos i obrada gvož a unutar kompleksa feritina su još uvek nedovoljno poznate. Molekul feritina sadrži osam lokacija za unos gvož a, 3-24 lokacija za oksidaciju gvož a, mesta za translokaciju, mineralno vezivanje i mineralizaciju, kao i 8 mesta za izlaz gvož a iz molekula (Theil, 2003). Posle redukcije u dvovalentni oblik (dejstvom askorbinske kiseline ili redukovani flavin adenin dinukleotida),gvož e napušta kompleks kroz pore apoferitina i služi za sintezu hemoglobina. Izvesna mala koli ina feritina nalazi se i u krvnoj plazmi kao dobar pokazatelj stanja depoa gvož a u organizmu.

Ako feritin izgubi apoferitinske podjedinice može do i do njegove agregacije u micelle hemosiderina koji tako e može da posluži za sintezu hemoglobina, ali je mobilizacija gvož a iz hemosiderina mnogo sporija nego iz feritina. Hemosiderin se obi no više nalazi u depoima u slu ajevima preoptere enja gvož em, kada je sinteza apoferitina i njegovo zasi enje gvož em maksimalno.

Višak slobodnog gvož a u jetri može dovesti do zna ajnog ošte enja tkiva, pa ak i ciroze jetre ili hepatocelulamog karcinoma usled generisanja RVK, lipidne peroksidacije i ošte enja DNK (Muñoz i sar., 2009).

Prelazak gvož a iz citozola u mitohondrije, gde se uklju uje u sintezu hema ili Fe-S proteina, posredovan je mitoferinom, proteinom koji je nedavno identifikovan (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010). U mitohondrijama, gvož e je vezano za multimerni protein frataksin, ime je onemogu eno njegovo u eš e u formiranju toksi nih slobodnih radikala (Bleackley i sar., 2009; Hentze i sar., 2010). Prisustvo frataksina je neophodno za de novo sintezu Fe-S proteina koji se smatraju "senzorima" nivoa gvož a u mitohondrijama (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010).

2.3.4. Metabolizam gvož a u makrofagima

Za efikasnu eritropoezu neophodno je prisustvo gvož a, folata, vitamina B₁₂ i hormona eritropoetina (Hentze i sar., 2010). Kako se intestinalnom resorpcijom gvož a obezbe uje manje od 10% dnevnih potreba ogranizma (dnevno se resorbuje 1 do 2 mg gvož a, dok je za eritropoezu potrebno oko 25 mg gvož a), ostatak se dobija recikliranjem gvož a iz unutrašnjih izvora organizma od strane makrofaga slezine, jetre i kostne srži (Hentze i sar., 2010).

Makrofagi su elije koje imaju sposobnost fagocitoze i bitnu ulogu u uro enom i elijski posredovanom imunom odgovoru. Pored toga, one fagocituju ostarele i ošte ene eritrocite. U makrofagima se hem razgra uje enzimom hemoksigenaza 1 (Hox1). Gvož e iz fagolizozomalnih vezikula izlazi u citoplazmu makrofaga posredstvom transportera DMT-1, koji je homolog transportera na apikalnoj membrani enterocita. Zbog toga se DMT-1 transporter naziva i protein makrofaga povezan sa prirodnom rezistencijom (natural resistance-associated macrophages protein 1 - NRAMP-1) (Bleackley i sar.,

2009; Hentze i sar., 2010). Makrofagi mogu da preuzimaju gvožđ e i iz drugih izvora: bakterija, apoptoti njih elija i plazme.

Kada se gvožđ e na e u makrofagima ono može, kao i u jetri, da se skladišti u dva oblika: kao feritin ili hemosiderin. Gvožđ e ostaje deponovano u citoplazmi makrofaga sve dok se u organizmu ne pojavi potreba za njim. Tada ono izlazi posredstvom Fpn1 za iju je aktivnost na membrani makrofaga neophodan ceruloplazmin, oksidaza koja se sintetiše u jetri. Zna aj ceruloplazmina u metabolizmu gvožđ a je veliki s obzirom na to da kada mu je aktivnost smanjena, ili u slu ajevima njegovog potpunog odsustva, dolazi do nagomilavanja gvožđ a u hepatocitima, makrofagima i neuronima, što uzrokuje ošte enja ovih elija, dok se nivo gvožđ a u krvi smanjuje (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010; Miyajima, 2003).

U fiziološkim uslovima, odnos intenziteta recikliranja gvožđ a od strane makrofaga i intestinalne resorpcije gvožđ a, determiniše nivo ovog metala u plazmi. S obzirom da reciklirano gvožđ e iz makrofaga izlazi putem Fpn1, njegova ekspresija na membrani makrofaga je veoma važna i dvojako je regulisana. Nakon fagocitoze eritrocita ekspresija Fpn1 se pove ava, dok se kod viška gvožđ a u organizmu hormon hepcidin vezuje za Fpn1 i smanjuje se njegova ekspresija na membrani makrofaga.

Vezivanje i skladištenje gvožđ a u makrofagima ima veliki zna aj i u spre avanju širenja odre enih infekcija i deo je odbrambene strategije doma ina. Skladištenjem gvožđ a u makrofagima smanjuje se koli ina koja je na raspolaganju odre enim patogenim bakterijama i na taj na in se, makar delimi no, spre ava njihova proliferacija.

2.4 Transferinski receptori (sTfR)

Humani transferinski receptor je transmembranski dimerni glikoprotein sastavljen od 2 identitne subjedinice molekulske mase 95kDa vezane disulfidnim mostovima. Svaka subjedinica vezuje jedan molekul transferina, a pri pH 7.4 afinitet transferinskih receptora je ve i za transferin koji nosi dva molekula Fe u odnosu na transferin sa jednim molekulom Fe i apotransferin (Feelders i sar., 1999). Transferinski receptori sa elija razli itih tkiva su strukturno i imunoški identitni, a njihov broj zavisi od stepena proliferacije, diferencijacije i potrebe za gvožđ em. Transferinski receptori eksprimirani na eritrocitnim prekurzorima u kostnoj srži, ine 75 % od ukupnog broja jer imaju velike potrebe za gvožđ em u sintezi hema. Ushodna regulacija TfR ekspresije rezultat je pove ane de novo sinteze TfR i/ili mobilizacije TfR iz rezerve.

Danas je potvrđeno postojanje dve izoforme transferinskih receptora TfR1 i TfR2. Dok je TfR1 prisutan na skoro svim tipovima ćelija, prisustvo TfR2 je ograničeno na hepatocite, eritroidne i ćelije tankog creva (Suominen i sar., 1997).

Na samoj ćelijskoj membrani molekuli TfR1 se akumuliraju u poljima koja su obložena klatrinom (engl. – clathrincoated pit), što i omogućava endocitozu kompleksa Tf-Fe²⁺-TfR1 formiranjem tzv. klatrinom obložene vezikule (engl. –clathrin coated vesicle). Navedene vezikule spajaju se u citoplazmi sa endozomom u kome u uslovima kisele sredine ($pH=5,5$), uz pomoć ATP-zavisne protonske pumpe, dolazi do odvajanja gvožđa od transferina, dok sam transferin bez gvožđa, tzv. apotransferin ostaje vezan za TfR1. Nakon odvajanja od transferina gvožđe se iz endocitotskih vezikula prebacuje u citoplazmu pomoću aktivnosti transportera dvovalentnih metala, DMT-1/Nramp2 (Fleming i sar., 1998; Su i sar., 1998). U citosolu gvožđe se vezuje za ATP kao nosač i stiže do konačnih odredišta, gde se sintetiše hemoglobin, feritin ili enzimi. Preko transportnih vezikula kompleks TfR1–apotransferin ponovo dospeva do plazmatske membrane, gde se u uslovima neutralne sredine ($pH=7,4$) apotransferin odvajava od TfR1, a njegovo mesto zauzima drugi molekul Tf. Nakon ponovnog vezivanja gvožđa za oslobođeni apotransferin ceo ciklus se ponavlja (Hansen i sar., 1993). Opisani proces recirkulacije TfR1 molekula se odvija ciklično, u pravilnim vremenskim razmacima (15–20 minuta), i nezavisno od stvaranja kompleksa sa transferinom (Watts, 1985).

Kawabat i sar. (1999) su otkrili gen koji kodira drugi molekul receptora za transferin tzv. TfR2. Funkcionalna ispitivanja navedenog molekula pokazala su veliku sličnost sa TfR1, ali i značajne razlike. Afinitet TfR2 prema transferinu je znatno manji, a sadržaj unutar ćelijskog gvožđa nije glavni regulator njegovog ispoljavanja. Informaciona RNK za TfR2 ne poseduje IRE sekvence (iron responsible elements), pa tako ne može biti pod direktnom kontrolom aktivnosti regulatorskih proteina zavisnih od unutar ćelijskog nivoa gvožđa (Kawabata i sar., 1999).

To je dodatno potvrđeno u eksperimentima sa donorima i akceptorima gvožđa. Pokazano je da ni povećanje, a ni smanjenje nivoa gvožđa, izazvano navedenim materijama, ne utiče na prisustvo TfR2 molekula. Prisustvo TfR2 molekula kod životinja sa nedostatkom TfR1 ne može da nadoknadi njegovu funkciju u smislu održavanja metabolizma gvožđa (Levy i sar., 1999). Tokom navedenog istraživanja pokazano je i da heliranje unutar ćelijskog gvožđa redukuje proliferaciju i smanjuje sintezu DNK u ćelijama koje ne sadrže TfR2, dok ne utiče na iste procese u ćelijama

koje sadrže navedeni molekul (Kawabata i sar., 2000). Na osnovu navedenih rezultata autori pretpostavljaju da je prisustvo TfR2 regulisano progresijom kroz elijski ciklus, a ne jednostavno sadržajem gvoža, kao i da navedeni molekul može direktno uticati na stepen proliferacije elija.

Detaljno poznavanje molekularnih mehanizama regulacije homeostaze gvoža ima i praktičnu primenu u savremenoj medicinskoj praksi. Nivo TfR1 u serumu, odnosno njegovog van elijskog dela koji se može enzimski odvojiti sa elijske membrane pokazao se kao veoma pouzdan pokazatelj smanjenja rezervi, odnosno funkcionalnog nedostatka gvoža u organizmu. Nasuprot tome, u uslovima povećanog sadržaja gvoža dolazi do povećanja nivoa feritina u serumu, dok je koncentracija solubilnog TfR1 minimalna. Zahvaljujući tome, u kliničkim studijama je potvrđeno da je odnos koncentracija navedenih molekula u serumu, izražen kao indeks TfR1/feritin, najosetljiviji i najpouzdaniji pokazatelj stepena poremećaja prometa gvoža u organizmu (Baynes, 1996).

2.5. Regulacija prometa gvoža na nivou elije

Sinteza transferinskih receptora i feritina je regulisana sa dva različita mehanizma, pri čemu nivo njihove sinteze suprotno utiče na koncentraciju gvoža u eliji. To uključuje interakciju citoplazmatskih RNK vezujućih proteina (iron regulatory proteins-IRP) sa IRE. Gvožđe zavisni elementi su kratke sekvence nukleotida iRNK koji kodiraju ključne proteine u regulaciji deponovanja i metabolizma Fe. Gvožđe regulatorni proteini vezuju se za IRE i regulišu translaciju i sintezu specifičnih proteina. Kada ima dovoljno gvožđa ono se vezuje za IRP, čime se sprečava njihovo vezivanje za IRE na iRNK. U deficijenciji gvožđa IRP se vezuju velikom afinitetom za IRE. Kao rezultat toga dolazi do smanjene translacije proteina feritina jer gvožđe nije dostupno za deponovanje, a sintetiše se DMT1. Translacija iRNK koja kodira sintezu ključnih enzima sinteze hema je takođe redukovana zbog smanjene količine raspoloživog gvožđa. U tim uslovima povećava se sinteza transferinskih receptora čime se povećava transport gvožđa u eliju. Obrnuto, kada je gvožđe u eliji u višku, IRP deluje kao akonitaza sa niskom RNK vezujućom aktivnošću, omogućavajući translaciju iRNK za feritin, što omogućava pretvaranje gvožđa u feritin. Ovaj regulatorni mehanizam omogućava elijama da koordiniraju ulazak gvožđa i rezervu gvožđa prema raspoloživosti i potrebama u gvožđu. Nezavisno od potreba elija za gvožđem, eritroidna proliferacija je važan stimulans za

TfR sintezu i ekspresiju. Eritropoetin deluje preko specifičnih površinskih receptora na eritroidnim progenitorskim ćelijama i stimuliše proliferaciju, diferencijaciju i TfR ekspresiju, preko aktivacije IRP (Casey i sar., 1988).

2.6. Zatvoreni krug metabolizma gvožđa

Organizam nema mogućnost aktivnog izliva gvožđa iz organizma. Male količine gvožđa napuštaju telo deskvamacijom mukoznih ćelija, a još manje količine putem žučnih, znojnih i mokraćnih puteva. Ukupno se na dan gubi oko 1mg gvožđa. Ravnoteža gvožđa je zbog toga suštinski zavisna od mehanizma aktivne apsorpcije u crevnoj sluzokoži (Beutler, 2007). Količina feritina u crevnoj sluzokoži može biti važna, jednako kao i ravnoteža između feritina i transferina. Dnevno kretanje gvožđa u organizmu prikazano je na Slici 2 (Rang i sar., 2006).

Danas se smatra da je homeostaza gvožđa u organizmu regulisana uglavnom apsorpcijom gvožđa iz intestinalnog trakta i reciklažom gvožđa iz starih eritrocita (Malyszko i Mysliwiec, 2007). Intestinalna apsorpcija gvožđa zavisi od zaliha uskladištenog gvožđa, što predstavlja prvi regulatorni mehanizam, kao i od količine gvožđa potrebnog za eritropoezu, tzv. eritroidnog regulatora, što je drugi regulatorni mehanizam (Finch i Huebers, 1982). Po prvom regulatornom mehanizmu apsorpcije gvožđa (tzv. skladišnom regulatoru), apsorpcija se smanjuje sa zasićenosti feritina, a poznato je da se dva do tri puta može povećati u stanjima deficita gvožđa u zalihama. Višak gvožđa koji feritin više ne može da primi zadržava se vezan za mobilferin crevnih epitelnih ćelija preko kojih se deo gvožđa gubi u crevni volumen i izliva se stolicom, te se tako sprečava preterana apsorpcija gvožđa. Ravnoteža gvožđa je zbog toga suštinski zavisna od mehanizma aktivne apsorpcije u crevnoj sluzokoži.

Drugi regulatorni mehanizam intestinalne apsorpcije uključuje eritroidni regulator koji menja apsorpciju gvožđa prema potrebama eritropoeze (Malyszko i Mysliwiec, 2007). Eritroidni regulator ima veliki kapacitet apsorpcije gvožđa od skladišnog regulatora i ima dominantnu ulogu u homeostazi gvožđa. On je najvažniji signal za apsorpciju i povećanje je nezavisno od količine deponovanog gvožđa. Kada su zalihe gvožđa popunjene, a apsorpcija se i dalje odvija, dolazi do nakupljanja gvožđa u telu i patološke eritropoeze koja dovodi do bolesti koje su uzrokovane viškom gvožđa u organizmu.

Danas se smatra da ulogu posrednika u eritroidnoj i skladišnoj regulaciji imaju mali cirkulišući i peptidni molekuli hepcidin koji nastaje u jetri. Njegov nivo je važan za

intestinalnu apsorpciju gvoža i otpuštanje gvoža iz makrofaga (Papanikolaou i Pantopoulos, 2005).

2.7. Heparin

Iz ultrafiltrata ljudske plazme 2000. godine izolovan je antimikrobni peptid koga proizvodi jetra (Krause i sar., 2000). Nazvan je LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide) prema mestu sinteze i biološkoj aktivnosti. Isti peptid pod drugim imenom - heparin (hepatic bactericidal protein) izolovao je Park 2001. godine (Park i sar., 2001) iz urina. U ljudskom urinu mogu se izolovati peptidi i sa 20 i 22 aminokiseline, ali je dominantno prisutan peptid sastavljen od 25 aminokiselina. Peptid od 25 i peptid od 20 aminokiselina, pokazali su antibakterijsko i antimikotično delovanje, pa su svrstani u antimikrobne peptide izolovane iz biljaka i životinja, tzv. defenzine, koje karakterišu unakrsne disulfidne veze. Istovremeno kada je izolovan LEAP-1, izolovani su i 22 aminokiselinski peptid, 20 aminokiselinski peptid i jedan znatno duži (40 aminokiselina) nazvan LEAP-2, koji su od manje važnosti. Peptid od 25 aminokiselina nazvan je heparin.

Heparin je definisan kao hormon koji reguliše metabolizam gvoža u uslovima viška gvoža u organizmu. Na eno je da mRNA heparina raste s većom količinom gvoža i opada s manjkom gvoža u organizmu (Pigeon i sar., 2001; Nicolas i sar., 2001).

2.7.1. Lokalizacija heparina

Heparin se primarno sintetizuje u jetri, a manje u bubrezima, srcu, skeletnim mišićima i mozgu. U bubrezima ovaj intrinzični renalni peptid sintetizuje se u epitelnim ćelijama distalnih tubula i sabirnim kanalima i izlazi u urinom (Malyszko i Mysliwiec, 2007; Kulaksiz i sar., 2005). Lokalizacija heparina u bubregu potvrđuje ulogu u regulaciji nivoa gvoža u renalnom tubularnom sistemu i povezanost sa transporterom gvoža DMT1. Ekspresija DMT1 je najveća na apikalnom polu epitelnih ćelija distalnih tubula i sabirnih kanala. Nedavna istraživanja su otkrila da se heparin sintetizuje i u neutrofilima i makrofagima aktiviranim bakterijskom infekcijom, mada u nižim nivoima nego u hepatocitima. Heparin je pronađen kod različitih vrsta kičmenjaka uključujući miševce, pacove, svinje i u nekim vrstama riba (Ganz i sar., 2006).

2.7.2. Struktura hepcidina

Hepcidin u formi polipeptida sastavljen od 25 aminokiselina ima značajnu povezanost sa metabolizmom gvožđa, dok je kod hepcidina sa 20 aminokiselina i drugih hepcidina dokazano samo antimikrobno delovanje. Hepcidin 25 je po svojoj strukturi mali peptid sa sledećom sekvencijom aminokiselina:

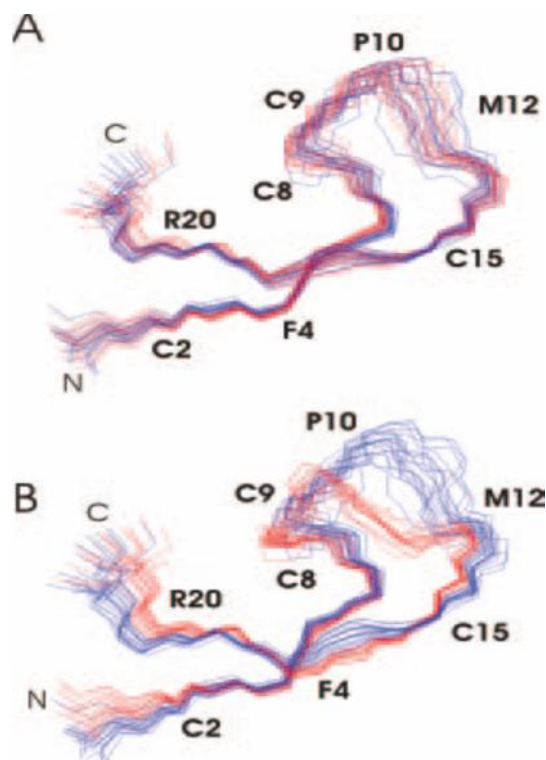
Asp- Thr- His- Phe- Pro- Ile- Cys- Ile- Phe- Cys- Cys- Gly- Cys- Cys- His- Arg- Ser- Lys- Cys- Gly- Met- Cys- Cys- Lys- Thr

Disulfidne veze se nalaze između cisteina: Cys7- Cys23, Cys10-Cys22, Cys13-Cys14 (Slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz hepcidina.

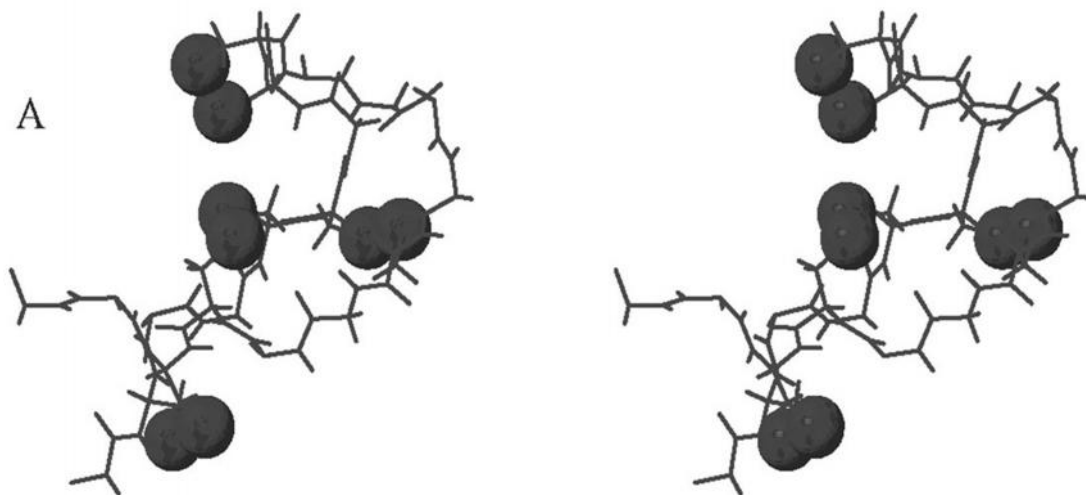
Određivanjem konformacije ovog peptida ustanovljeno je da je peptidni lanac uvrnut poput ukosnice (30 % strukture je uvrnuto) sa jednim dužim krajem (Slika 5).



Slika 5. Struktura prikazana sa različitim načinima disulfidnog vezivanja.

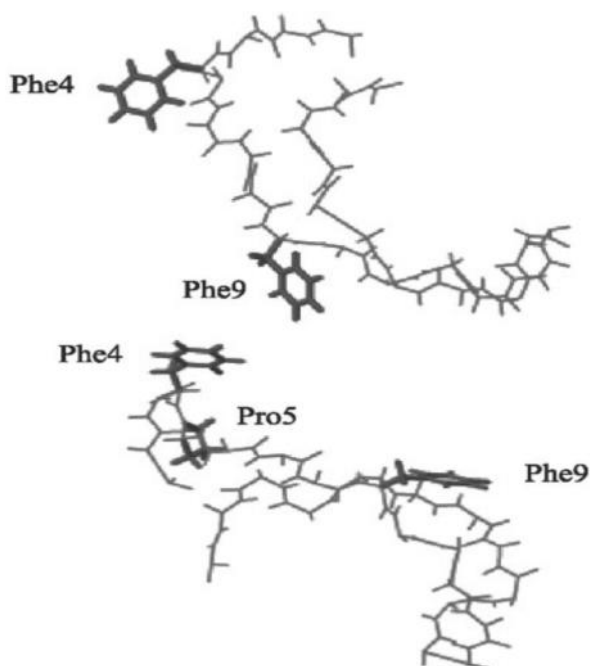
Iz ove strukture je vidljiv uticaj disulfidnih veza na stabilnost poprečnim povezivanjem dva kraka ukosnice. Peptid pripada amfipatskom tipu molekula s obzirom na duži nepolarni lanac i polarne krajeve lanca. Polarni krajevi su: N-terminalna amino grupa asparaginske kiseline, C-terminalna karboksilna grupa treonina, kao i pripadaju i nabijeni lanci sa gama karboksilnom grupom asparaginske kiseline, epsilon amino grupa lizina pri C-kraju, i hidroksilne grupe treonina na oba kraja lanca. Na krivini molekula, na suprotnom kraju lanca nalaze se polarni ogranci arginina i još jednog lizina u molekulu. Sekundarna struktura ovog peptida pripada beta naboranom tipu na 30% dužine lanca. Međutim u hepcidinu postoji i karakteristična disulfidna veza vicinalnog tipa između Cys13 i Cys14 blizu krivine u lancu pri čemu se formira osmočlani prsten koji doprinosi određenoj rigidnosti strukture i konačnoj konformaciji sa uvrnutošću od 42%, s konkavnim i konveksnim delovima.

Na sledećoj strukturi disulfidne veze su prikazane crnim krugovima pri čemu je na vrhu smeštena vicinalna S-S veza, za koju je ustanovljena *trans* konfiguracija dva cisteina (Slika 6).



Slika 6. Konformacija hepcidina 25 sa istaknutim disulfidnim vezama u obliku crnih kugli.

Ustanovljeno je da se za razliku od hepcidina-20, hepcidin-25 ima veći molekularni prostor što je uslovljeno hidrofobnom interakcijom između fenilalanina (Phe9) jednog monomera, sa fenilalaninom (Phe4) drugog molekula, što je prikazano formiranjem agregata (Slika 7).



Slika 7. Intermolekularna interakcija Phe9 jednog monomera sa Phe4 drugog monomera hepcidina 25 - po etak agregacije.

Obzirom da hepcidini imaju veliku sličnost sekundarne strukture (procenat beta naborane strukture, zavijenosti i uvrnutosti), pa i tercijarne strukture, njihova je aktivnost približna bez obzira na vrstu i redosled aminokiselina (Nemeth i sar., 2006). Biosinteza

hepcidina zapo inje od preprohepcidina koji se sastoji od 84 aminokiselina u lancu, koji se pomo u konvertaze prevodi u propeptid hepcidin, a on generiše bioaktivni hepcidin-25 (Hunter i sar., 2002).

2.7.3. Odnos strukture i delovanja hepcidina

Za hepcidine razli itih dužina lanaca ustanovljeno je antimikrobno delovanje (antibakterijsko i antimikotino), a samo za neke, naro ito hepcidin-25, i delovanje na homeostazu gvoža (Nemeth i sar., 2006). Za hepcidin-20 je dokazano ve e delovanje protiv *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus* grupe B i *Candida albicans* (Hunter i sar., 2002). Hecpidin-25 deluje na gram negativne (npr. *Bacillus subtilis*) i gram pozitivne (npr. *Neisseria cinerea*) bakterije, i gljivicu (*Saccharomyces cerevisiae*). Iako hepcidin-25 ima antibakterijsko i antimikotino delovanje u opsegu koncentracije 3-10 μM , urinarna koncentracija se kre e unutar 3-30 nM, zbog ega se dovodi u pitanje i antimikrobna aktivnost hepcidina u urinu (Atanasiu i sar., 2006; Krause i sar., 2000).

U pore enju delovanja hepcidina 25 i hepcidina 20, hepcidin 20 ne pokazuje delovanje na homeostazu gvoža, jer ne poseduje prvih pet aminokiselina na N-terminalnom kraju, a za takvu aktivnost je bitna dužina lanca. Skra ivanjem lanca za jednu aminokiselinu sa po etka lanca, ustanovljeno je progresivno smanjivanje aktivnosti hep-25 sve do minimalne kod hep-20 (Tabela 3) (Nemeth i sar., 2006).

Sa druge strane, produžavanjem lanca za jednu aminokiselinu (Ala) aktivnost se potpuno zadržava (hep26) (Tabela 3). Ispitivana je i uloga cisteina i S-S veza tako što su prepravljani peptidi koji umesto cisteina sadrže alanine. Iz tablice je vidljivo da zamena tri od etiri disulfidne veze sa alaninima (A7/A23, A11/A19, A13/A14) (Tabela 3) nije bitno smanjila aktivnost hepcidina *in vitro*, što zna i da disulfidne veze direktno ne uti u na aktivnost ve samo na stabilnost strukture. N-terminalni kraj hepcidinskog molekula esencijalan je za aktivnost tj.njegovu ulogu u homeostazi gvoža (Nemeth i sar., 2006).

Tabela 3. Bioaktivnost hepcidinskih derivata

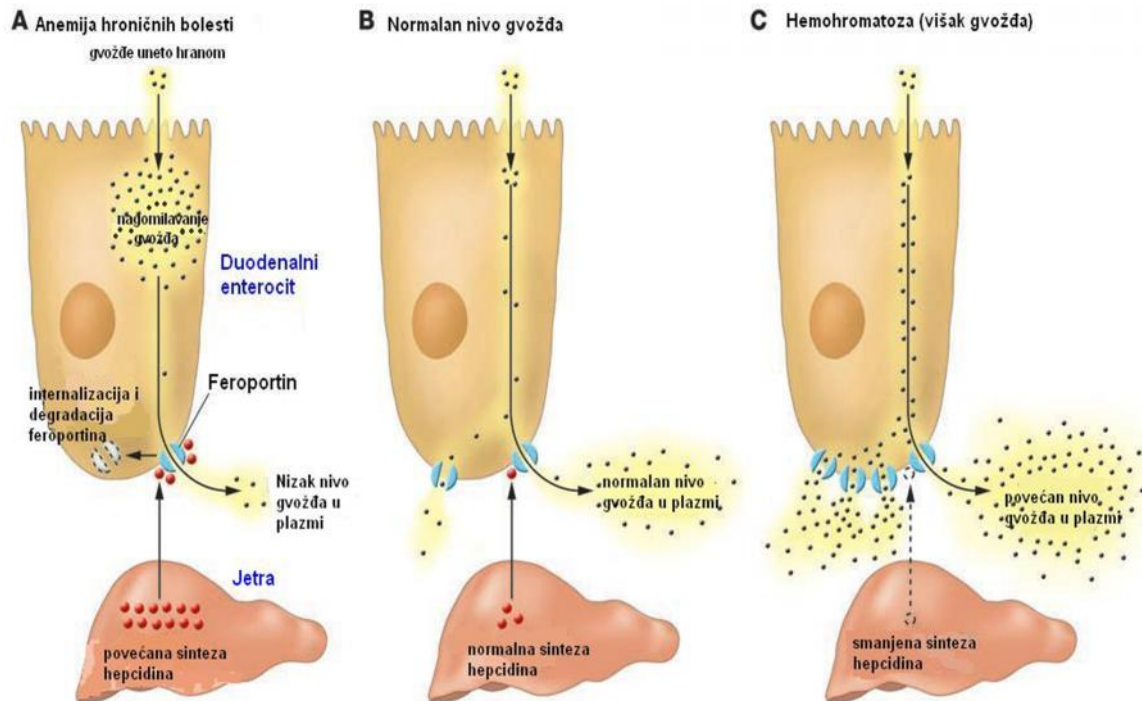
Peptidi	aktivnost
Hep 25	100
Hep 24	95±4
Hep 23	88±4
Hep 22	46±6
Hep 21	22±3
Hep 20	12±1
Hep 26	100±1
A7/A23	85±3
A11/A19	92±6
A13/A14	92±12
hep-25 iz ribe	106±10

2.7.4. Delovanje hepcidina

Istraživanja na životinjama pokazala su da se ovaj hormon stvara u uslovima gomilanja gvož a. Povezanost hepcidina sa homeostazom gvož a ustanovljena je pra enjem njegovog nivoa u zavisnosti od unosa gvož a bilo hranom ili parenteralnom aplikacijom miševima (Hugman i sar., 2006). Eksperimentima je ustanovljeno inhibitorno delovanje hepcidina na nivo gvož a (negativna povratna sprega).

Hepcidin se sekretuje u cirkulaciju i deluje na enterocite tankog creva gde reguliše nivo resorpcije gvož a kontrolom ekspresije Fpn1 na njihovoj bazolateralnoj membrani (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009). Vezivanjem hepcidina za ferroportin zapo inje se njegova internalizacija i degradacija u lizozomima. Smanjenjem gustine molekula Fpn1 u elijskoj membrani intracelularno gvož e ostaje u citoplazmi. Hepcidin deluje i na Fpn1 prisutan na membranama makrofaga i hepatocita i tako smanjuje osloba anje gvož a iz ovih elija u sistemska cirkulaciju (Muñoz i sar., 2009). Kada je nivo hepcidina visok, kao što je to slu aj u upalnim stanjima, resorpcija gvož a iz enterocita, kao i njegovo osloba anja iz hepatocita i makrofaga u sistemska cirkulaciju je smanjeno. Gubitak Fpn1 sa površine elija dovodi do zadržavanja gvož a u makrofagima, niskog nivoa u plazmi što dovodi do niske saturacije transferina, pa se manje gvož a prenosi do eritroblasta (De Domenico i sar., 2007) (Slika 8A). To uzrokuje smanjenu eritropoezu koja dovodi do anemije koja je poznata pod imenom anemija upale ili anemija hroni nih

bolesti. Nasuprot tome, kada je nivo hepcidina smanjen, npr. usled anemije ili hipoksije resorpcija gvoža je povećana (Muñoz i sar., 2009; Hentze i sar., 2010; Franchini i sar., 2010).



Slika 8. Hepcidin - medijator homeostaze gvoža. (A) Povećana sinteza hepcidina u jetri kao rezultat upale. (B) Normalni nivo hepcidina kod adekvatnog nivoa gvoža, reguliše unos gvoža u plazmu, normalno zasićenje transferina i normalan nivo eritropoeze. (C) Hemohromatoza ili višak gvoža, rezultat je smanjenih nivoa hepcidina.

Smanjena sinteza hepcidina dovodi do viška gvoža u organizmu. Manjak hepcidina uzrokuje povećanu prisutnost ferroportina na površini ćelija i time povećan unos gvoža u plazmu, visoku zasićenost transferina i povećanje depoa gvoža u jetri i drugim organima (Slika 8C) (De Domenico i sar., 2007).

Bolesti viška gvoža uzrokovane smanjenom sintezom hepcidina zovu se hemohromatoze i pretežno su izazvane genetskim poremećajima. Primarne hemohromatoze su poremećaji nastali zbog mutacije gena za hepcidin, a višak gvoža može nastati i sekundarno (sekundarna hemohromatoza), na primer u ostalim transfuzijama krvi.

Pored sistemske regulacije, putem regulacije gustine molekula feroportina, metabolizam gvoždja je regulisan i na ćelijskom nivou posredstvom regulatornih proteina IRP koji se vezuju za mesta na iRNK IRE i tako regulišu nivo transkripcije proteina uključenih u metabolizam gvoždja. Sistemski i ćelijski regulatorni mehanizmi ne funkcionišu zasebno, već koordinišu svoju aktivnost u istom pravcu povećavaju i ili smanjuju i nivo resorpcije gvoždja (Hentze i sar., 2010).

Sinteza hepcidina u hepatocitima je regulisana mnogostrukim, delom i suprotnim signalima koji uključuju: koncentraciju gvoždja u organizmu (prevažodno količinu Tf-Fe₂), količinu gvoždja u deponima u jetri, intenzitet eritropoeze, hipoksiju i stanja inflamacije. Svi ovi signali se sumiraju na nivou transkripcije DNK i od zbira njihovih efekata zavisi da li će ići do stimulacije ili inhibicije sinteze hepcidina (Bleackley i sar., 2009; Franchini i sar., 2010).

2.7.5. Mehanizmi kontrole sinteze hepcidina

U organizmu postoje proteini koji su osetljivi na promene koncentracije sistemskog gvoždja i koji mogu da utiču na sintezu hepcidina. Novija istraživanja intenzivno se bave proučavanjem mehanizama dejstava tih molekula, pre svega hemohromatoznog proteina (HFE) i hemojuvelina (HJV), koji se sintetisaju u hepatocitima (Bleackley i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009; Franchini i sar., 2010) (slika 9).

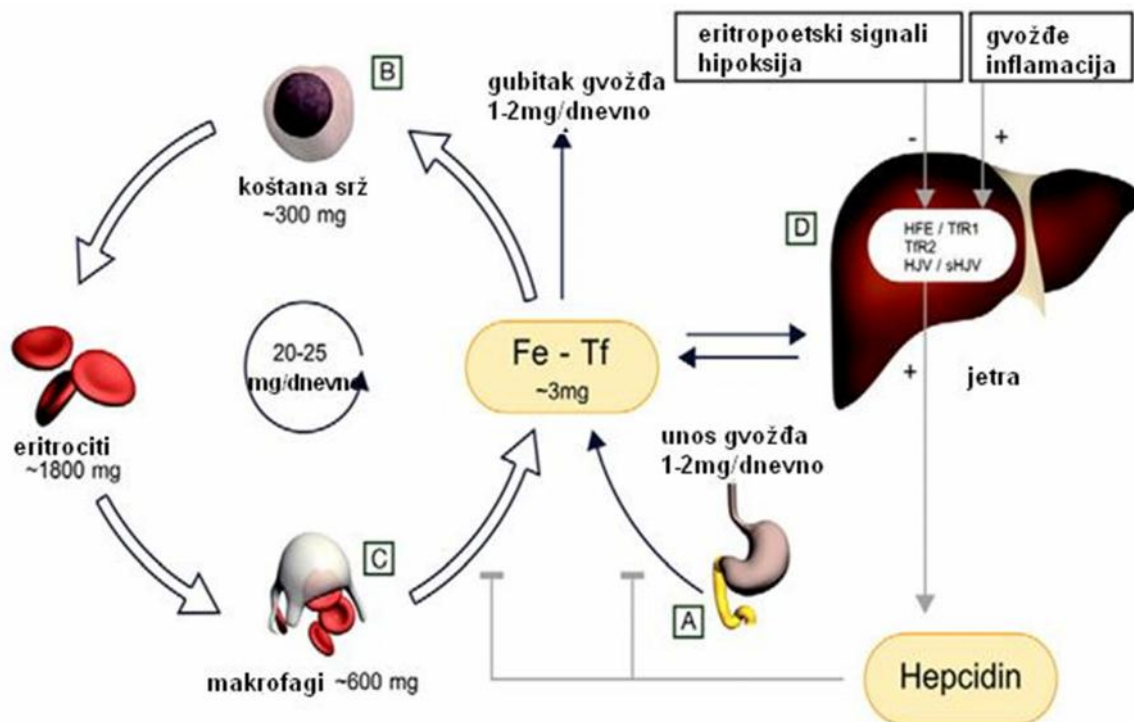
2.7.5.1. Uloga HFE i HJV

Tačna uloga HFE u regulaciji resorpcije gvoždja još uvek nije do kraja razjašnjena. HFE je u niskim koncentracijama prisutan u mnogim tkivima, a najviše u jetri i tankom crevu, dok se u plazmi nekovalentno vezuje za α_2 -mikroglobulin (Bleackley i sar., 2009). HFE može da se veže za TfR1 i TfR2 na membrani hepatocita. Zna se da je nivo HFE obrnuto srazmeran resorpciji gvoždja, tako da je povećana ekspresija HFE povezana sa smanjenom resorpcijom gvoždja, a njegovo odsustvo sa akumulacijom gvoždja. Smatra se da HFE funkcioniše kao senzor nivoa gvoždja u organizmu i mehanizam kojim HFE utiče na sintezu hepcidina je sledeći: kada je normalan ili snižen nivo Tf-Fe₂ (odnosno gvoždja) u plazmi, HFE se vezuje za receptor TfR1. Međutim, kada postoji visok nivo gvoždja, tj. Tf-Fe₂, on će istiskivati HFE iz kompleksa sa receptorom TfR1, te će se HFE u tom slučaju vezivati za TfR2, za koji inače ima manji afinitet. Kompleks HFE-TfR2

predstavlja tzv. transferin - osetljivi kompleks i aktivira sintezu hepcidina (Bleackley i sar., 2009; Hentze i sar., 2010; Goswami i sar., 2006).

Kvantitativno najznačajniji put stimulacije sinteze hepcidina je preko BMP (eng. BMP - bone morphogenetic protein), čija je ekspresija pozitivno regulisana koncentracijom gvožđa: povećana je u stanjima preopterećenja, a smanjena kod deficita gvožđa (Bleackley i sar., 2009; Hentze i sar., 2010). Za BMP se vezuje hemojuvelin kao koreceptor i ovaj kompleks u jedru stimuliše transkripciju gena za hepcidin. U stanjima hipoksije i niskih koncentracija gvožđa, dolazi do hidrolize HJV, pri čemu se on oslobađa i izlučuje u obliku rastvorljivog hemojuvelina (sHJV), koji antagonizuje BMP zavisnu aktivaciju sinteze hepcidina. Zbog visokih koncentracija u skeletnim mišićima, smatra se da HJV predstavlja mišićni signal deficita gvožđa.

Aktivnost hemojuvelina i hemohromatoznog proteina je koordinisana i njihova zajednička aktivnost dovodi do povećane sinteze hepcidina (Bleackley i sar., 2009; Hentze i sar., 2010).



Slika 9. Hipoteti ka uloga hepcidina u regulaciji metabolizma gvožđa

2.7.5.2. Eritropoetski signali

Eritropoeza je proces tokom koga se troše značajne količine gvožđa, pa je zato inhibicija sinteze hepcidina od strane eritropoetskih signala od velikog fiziološkog značaja. Molekularni mehanizmi i faktori uključeni u ovu regulaciju još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da su u inhibiciju sinteze hepcidina uključena dva molekula poreklom iz prekursora eritrocita: GDF15 i TWSG1 (Hentze i sar., 2010, Pak i sar., 2006). Za TWSG1 protein postoji vezujuće mesto na molekulu BMP i on inhibira BMP zavisnu aktivaciju sinteze hepcidina (Hentze i sar., 2010). Takođe, na miškim modelima je pokazano da visoke koncentracije ovog molekula mogu da suprimiraju transkripciju hepcidina, mada mehanizam kojim je ovaj efekat posredovan nije utvrđen. Kod pacijenata kod kojih postoji defektna eritropoeza, kao što je npr. B-talasemija, pronađene su visoke koncentracije GDF15 u serumu (Hentze i sar., 2010).

2.7.5.3. Hipoksija

Hipoksija *in vivo* indukuje sintezu eritropoetina u bubregu, koji deluje kao glavni i snažni stimulator eritropoeze. Egzogeni eritropoetin u niskoj dozi brzo zaustavlja sintezu hepcidina i njegovo izlučivanje urinom (Hentze i sar., 2010), ali taj efekat je najverovatnije indirektan preko stimulacije eritropoeze i njenih faktora koji utiču na sintezu hepcidina. U jetri je otkriveno i prisustvo hipoksijom-indukovanog faktora, koji vezivanjem za promoterski region DNK inhibira sintezu hepcidina (Hentze i sar., 2010).

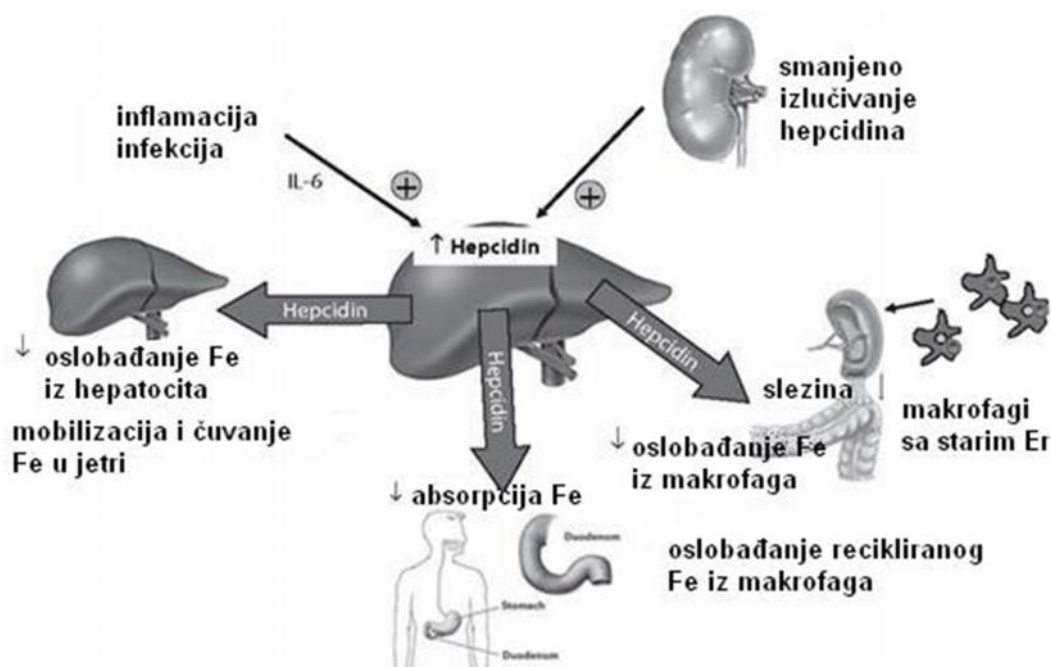
2.7.5.4. Inflamacija

Višak gvožđa u organizmu smanjuje odbrambenu sposobnost fagocita, što u ovim stanjima može dovesti do razvoja oportunističkih infekcija različitim, neuobičajenim patogenima. Gvožđe igra dvostruku ulogu u inflamatornim stanjima: a) rast, razmnožavanje i virulencija patogena u velikoj meri zavise od količine gvožđa u organizmu domaćina i njene dostupnosti patogenu i b) višak gvožđa smanjuje imuni odgovor domaćina na infekciju. Zato se u stanjima inflamacije i stresa uključuju regulatorni putevi koji smanjuju resorpciju gvožđa iz tankog creva, a istovremeno favorizuju njegovo zadržavanje u makrofagama. Na taj način se pojačava odbrambena sposobnost domaćina, a gvožđe neophodno za proliferaciju patogena postaje nedostupno (Ashrafian, 2005).

Hepcidin nije samo važan hormon u regulaciji gvož a, on je i važna veza između metabolizma gvož a, odbrane doma i upale. Jetra ima važnu ulogu u imunom odgovoru budu i da je odgovorna za sintezu mnogih proteina akutne faze koji su uključeni u imunološki odgovor. Proteini akutne faze nastaju kao odgovor na akutnu i hroničnu upalu, infekciju, traumu, i neoplazmu (Malyszko i Mysliwiec, 2007). Tokom infekcije i upale, sinteza hepcidina se znatno povećava prisutnošću interleukina (IL-1 i IL-6) koji snažno indukuju sintezu hepcidina (Hugman, 2006). U toku upalnih stanja i infekcije dolazi do povećane sinteze hepcidina mehanizmom koji je nezavisan od statusa gvož a i aktivnosti eritropoetina. U ovom inflamatornom odgovoru učestvuju i signali posredovani sa BMP koji se, sa signalnim putevima posredovanim IL-6, integrišu na nivou promotorskog regiona za hepcidin.

Plazmatski transferin prenosi oko 20 mg gvož a, koje najvećim delom nastaje destrukcijom starih eritrocita i namenjeno je eritropoezi. U normalnim stanjima gvož e u plazmi se izmenjuje svaka 3- 4 sata. U slučaju kad bi hepcidin blokirao recikliranje gvož a, to bi rezultiralo smanjenjem od oko 30% gvož a u plazmi kroz sat vremena. Ovaj akutni hipoferejni odgovor verovatno je namenjen eliminaciji invazivnih mikroorganizama. Vremenski brzo sniženje gvož a je kompatibilno sa ulogom hepcidina u imunitetu kao prva linija obrane od invazivnih patogena. Za vreme upale hepcidin inhibira otpuštanje gvož a iz makrofaga i enterocita. Budući da je najveći deo gvož a u transferinu namenjen eritropoezi u kostnoj srži, hipoferecija rezultira smanjenjem dostupnosti gvož a za eritropoezu. Anemija upale nastaje kao posledica hipoferejnog odgovora na upalu (Slika 10). Dallaglio i sar. (2006) objavili su da hepcidin doprinosi anemiji upale ne samo svojim delovanjem na metabolizam gvož a, već i inhibicijom proliferacije eritroidnih progenitora i njihovog preživljavanja. Pretpostavlja se da ovaj mehanizam doprinosi slabom odgovoru eritropoeze na hipoksiju u anemiji (Malyszko i Mysliwiec, 2007). Kaskada poremećaja koja dovodi do anemije upale kreće se od IL-6 do sinteze hepcidina, pa do hipoferecije i na kraju rezultira anemijom upale (Ganz i sar., 2006).

Inflamatorni citokini kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, i IFN- γ , pored toga što utiču na sintezu hepcidina, stimulišu i sintezu feritina i smanjuju ekspresiju TfR1 receptora, te na taj način povećavaju skladištenje gvož a, a smanjuju njegovu dostupnost eritrocitima (Hentze i sar., 2010).



Slika 10. Mehanizam delovanja hepcidina u anemiji hroni nih bolesti

2.7.6. Uloga hepcidina u anemiji HBI

Patogeneza anemije hroni ne bolesti bubrega je multifaktorijalna. Iako je nedovoljna proizvodnja eritropoetina najvažniji inicijator u patogenezi anemije HBI, i drugi faktori kao smanjenje preživljavanja eritrocita, gubitak krvi, nedovoljno unošenje gvožđa i drugi nutritivni nedostaci, hemoliza kao i uremija, imaju bitnu ulogu i doprinose blagoj anemiji. Ona je često prisutna uprkos terapiji rekombinantnim humanim eritropoetinom i drugim stimulansima eritropoeze. Kod uznapredovale bubrežne bolesti potrebna je hemodijaliza pri kojoj se takođe dodatno gubi gvožđe. Bolesnici na hemodijalizi gube prosečno 2 g gvožđa godišnje ili do 1,5-3 L krvi. Nedostatak gvožđa razvija se kod gotovo svih bolesnika na hemodijalizi koji dobijaju pored preparata gvožđa i rekombinantni humani eritropoetin. Apsolutni nedostatak gvožđa je najčešće prisutan u zadnjoj fazi bubrežne bolesti, kada zasićenje transferina padne ispod 20% (Malyszko i Mysliwiec, 2007; Eschbach i sar., 1977).

Poznato je da kod bolesnika sa bubrežnom insuficijencijom može nastati i funkcionalni nedostatak gvožđa (niska saturacija transferina uz normalni ili povišen serumski feritin). On se karakteriše prisutnošću dovoljnih rezervi gvožđa prema konvencionalnim kriterijumima, ali i nesposobnošću da se gvožđe dovoljno mobilizuje i da adekvatno stimuliše eritropoezu uz primenu eritropoetina. Klinički je značajno razlikovati

funkcionalni manjak gvoždika, koji obično reaguje na terapiju nadoknade gvoždika, sa porastom hematokrita pri ujednenoj dozi rekombinantnog humanog eritropoetina, od blokade gvoždika izazvanu infekcijom, koja ne reaguje na navedenu terapiju (Malyszko i Mysliwiec, 2007).

Hipoksija je primarni signal koji reguliše proizvodnju eritropoetina u fetalnoj jetri i u bubregu odraslih, a istovremeno smanjuje proizvodnju hepcidina. Ekspresija gena za eritropoetin je kontrolisana HIF-om, a i promotor hepcidina sadrži nekoliko veznih mesta za HIF. Hipoksija izazvana anemijom indukuje sintezu EPO, a smanjuju ekspresiju jetrinog hepcidina, budući da anemija na krv ne može donositi dovoljno kiseonika iz peritubularnih kapilara u tubularne ćelije koje su veliki potrošači kiseonika. Rezultati istraživanja ukazuju da hipoksija deluje na indukciju eritropoeze i smanjenu ekspresiju gena za hepcidin putem regulacije lučenja eritropoetina (Nicolas i sar., 2002).

Međutim, kod hroničnih bubrežnih bolesti, ekspresija hepcidina može biti i povećana. Kod bolesnika sa hroničnom bolešću u bubrega prisutno je hronično zapaljenjsko stanje izazvano mnogim činiocima, uključujući i pojačanu uestalost infekcija, uremiju, povišene nivoe proinflamatornih citokina, čestu prisutnost ateroskleroze i drugih. Postoje dodatni faktori koji tokom hemodijalize mogu doprineti tom procesu (ne ista dijaliza, bioinkompatibilne membrane, interkurentne infekcije). Eksperimentalni modeli upale pokazali su povećanje ekspresije hepcidina i redukciju serumskih nivoa gvoždika. Budući da se bolesnici sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom nalaze se u stanju blage do srednje upale, slično kao u reumatoidnom artritisu ili malignoj bolesti, Alien i sar. (1999) su predložili hipotezu po kojoj bolesnik koji zahteva veće doze eritropoetina ima i veću upalnu aktivnost i propagaciju citokina. Interakcija proinflamatornih citokina sa hepcidinom, može objasniti zašto ovi bolesnici imaju visoke nivoe feritina, slabu apsorpciju gvoždika i smanjeno otpuštanje gvoždika iz makrofaga. Visoki nivoi hepcidina nađeni su kod bolesnika sa hroničnom renalnom insuficijencijom i anemijom (Pertosa i sar., 2005).

Pertosa i sar. (2005) su sugerisali da disregulacija hepcidina povezana sa upalom može izazvati funkcionalni manjak gvoždika i posledično manji odgovor na eritropoetin u uremičnim bolesnicima. Takođe su primetili da peritonealna dijaliza, smanjuje i upalni odgovor i serumske nivoe hepcidina, povećava odgovor na eritropoetin. Iz navedenog je vidljiv vrlo kompleksan odnos hepcidina i bubrežnih bolesti obzirom na antagonistički

uticaj zapaljenskih stanja s jedne strane, a sa druge strane uticaj anemije/hipoksije na ekspresiju hepcidina (Malyszko i Mysliwiec, 2007).

2.8. Folna kiselina

Folna kiselina je vitamin koji je rastvorljiv u vodi, pa se tako odstranjuje tokom hemodijalize. Proteklih godina je preporuivana redovna nadoknada folata za pacijente na dijalizi. Dokazano je da 2 mg folata nedeljno može održati balans folata kod ovih pacijenata. Klinički značajna deficijencija folata se retko javlja kod hroničnog bubrežnog oboljenja sve dok je unos folata putem hrane regularan. Dodavanje folne kiseline proizvodima od žitarica smanjilo je učestalost deficijencije kod opšte populacije i poboljšalo unos nutritivnih folata (Liaugaudas i sar., 2001). Određeni broj ispitivanja je potvrdio da nije potrebno unositi suplemente folata kako bi se održao normalan nivo i hematopoeza, čak i kod pacijenata na dijalizi (Westhuyzen i sar., 1993; Ono i Hisasue, 1992; Westhuyzen, 1998). Dodatni suplementi folne kiseline nemaju povoljni efekat na eritropoezu niti na odgovor na eritropoetin kod pacijenata sa znatno smanjenim nivoima folata (Ono i Hisasue, 1992; European best practice guidelines, 1999). Rutinska nadoknada folata kod pacijenata na hroničnoj dijalizi se ne preporučuje kao standardna terapija kod renalne anemije (European best practice guidelines, 1999). Usled nepostojanja toksinosti i usled mogućeg povoljnog uticaja suplemenata, u mnogim jedinicama za dijalizu postoji praksa rutinske nadoknade folata 1-5 mg folata/dnevno kod pacijenata na hroničnoj hemodijalizi (Westhuyzen, 1998).

Deficijenciju folata obavezno treba uzeti u obzir kod značajnih povećanja korpuskularnog volumena eritrocita ili kod hipersegmentiranih polimorfonuklearnih leukocita kod pacijenata sa hroničnom renalnom insuficijencijom. Kod neuhranjenih pacijenata ili kod istorije alkoholizma, naročito se preporučuje procena stanja folata, jer je deficijencija folata kod ovih grupa pacijenata veoma česta (Van Wyck, 2000). Nepostojanje odgovora na terapiju rHuEPO, prilikom makrocitozom, često ukazuje na deficijenciju folata ili vitamina B12, pa odmah treba analizirati njihov nivo.

Neki poremećaji metabolizma folata su specifični za hronično bubrežno oboljenje. Rani simptomi izmenjenog transporta folata kod bubrežnog oboljenja su nesrazmerno povišeni nivoi folata u serumu u poređenju sa rezervama folata u tkivima kod pacijenata na hemodijalizi. Takođe je bitan i način merenja rezervi folata. Serumski folati na prvom mestu prikazuju sliku skorašnjeg unosa vitamina putem hrane i nisu dobar pokazatelj

stanja rezervi (Lee i sar., 1999). Adekvatna procena rezervi folata kod pacijenata na dijalizi podrazumeva i odreivanje folata u eritrocitima. Ove vrednosti folata su visoke kod pacijenata sa prateom deficijencijom gvoža, koja je prisutna kod hroni nog bubrežnog oboljenja (European best practice guidelines, 1999).

2.9. Vitamin B12

U ljudskom organizmu se nalazi približno 5 mg (prema drugim podacima 2 mg), a dnevno se gubi oko 2,5 mikrograma. Depo se nalazi u jetri (50 – 90%). Klini ki znaci deficijencije se javljaju kada nivo padne na 10% normalnih vrednosti.

Nizak nivo ovog hidrosolubilnog vitamina u serumu kod bolesnika na hemodijalizi je tako e posledica uklanjanja putem dijalize. Kod pacijenata sa hroni nim bubrežnim oboljenjem davanje vitamina B12 zna ajno smanjuje rizik od komplikacija (Fehrman-Ekholm i sar., 2008). Pacijenti na hroni nom programu hemodijalize imaju visok nivo aminokiseline, homociteina koja ima toksi an efekat. Visok nivo homocisteina kod ovih bolesnika pove ava rizik nastanka infarkta srca i mozga, tako što dovodi do ubrzane ateroskleroze (Chiu i sar., 2009). Nekoliko studija je ukazalo da nadoknada vitamina B6, B12 i folne kiseline može smanjiti nivo homocisteina kod pacijenata na hemodijalizi (Robinson i sar., 1996; Sunder-Plassmann i sar., 2000; Tremblay i sar., 2000; Elian i Hoffer, 2002; Kaplan i sar., 2001; Billion i sar., 2002). Utvr eno je da kod bolesnika na hemodijalizi davanje vitamina B12, u dozi od 1 mg nedeljno, smanjuje nivo homocisteina do 30%. U opštoj populaciji vitamin B12 snižava nivo homocisteina do 7% (Homocysteine Lowering Trialist's Collaboration, 1998).

Nedostatak vitamina B12 se dešava retko (Zachee i sar., 1992) ali se može javiti zbog gubitka u dijalizatu, posebno sa visokim membranskim protokom. Deficit vitamina B12 dijagnostifikuje se kasno, jer su depoi u jetri dovoljni za 3 do 5 godina. Gastaldello i sar. (1995) tokom petogodišnjeg pra enja su utvrdili da uz intravensko dodavanje vitamina B12 (u dozi 0,5 mg mese no) kod pacijenata na dijalizi sa visokim membranskim protokom održava koncentraciju ve u od normalne u plazmi za period od oko godinu dana.

Ve pomenute membrane sa visokim protokom, ali i primena eritropoetina mogu dovesti do subnormalnih nivoa vitamina B12.

Pošto je vitamin B12 vezan za proteine, teško je dijagnostifikovati njegov nedostatak, pa ve ina izveštaja u literaturi pokazuju normalan ili visok nivo vitamina

B12 u plazmi kod bolesnika na hemodijalizi (Descombes i sar., 1993). Nedostatak vitamina B12 može se dijagnostikovati i pri povišenim koncentracijama metilmaloni ne kiseline, i pored normalnih nivoa u serumu.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

Iako se o osnovnim patofiziološkim dešavanjima kod anemija pacijenata sa HBI ve dosta zna, još uvek postoje neke dileme o metabolizmu gvođa, na inima preuzimanja i kontrole njegove koncentracije. Zato je cilj ove doktorske disertacije da se kod pacijenata na hemodijalizi, u predijaliznom periodu kao i u kontrolnoj grupi:

- odrede opšti biohemijski (urea, kreatinin, proteini, albumini, glukoza, elektroliti, enzimi jetre, bilirubin i CRP) i lipidni parametri (trigliceridi, holesterol, LDL i HDL holesterol)
- odrede hematološki parametri važni za dijagnostiku anemije (Le, Er, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC i trombociti)
- odrede standardni biohemijski parametri kojima se prati metabolizam gvođa (gvođe, UIBC, TIBC, %Sat i feritin)
- odredi koncentracija hepcidina i solubilnih transferinskih receptora (sTfR)
- odredi koncentracija vitamina B₁₂ i folne kiseline
- utvrde korelacije značajnih anemijskih parametara i parametara metabolizma gvođa između u svih ispitivanih grupa
- odrede parametri metabolizma gvođa u grupi pacijenata sa različitim vrednostima feritina (gvođe, UIBC, TIBC, %Sat, hepcidin, sTfR i CRP)
- utvrde prediktivne vrednosti koncentracije gvođa, hepcidina, sTfR i feritina kod pacijenata na hemodijalizi
- utvrdi senzitivnost i specifičnost prosečnih vrednosti feritina, hepcidina i sTfR u klasifikaciji ispitanika na one sa saturacijom preko/ispod 30%.
- proceni značaj određivanja koncentracije hepcidina i sTfR u regulaciji metabolizma gvođa kod pacijenata na hemodijalizi

3.2. Hipoteze istraživanja

Obzirom da u osnovi anemije kod predijaliznih i dijaliznih bolesnika leži nedostatak eritropoetina, a time i poremećaj metabolizma gvožđa, hepcidina i transferinskih receptora formulisane su sledeće radne hipoteze istraživanja:

- Hematološki parametri važni za dijagnostiku anemije se značajno razlikuju kod pacijenata na hemodijalizi i u predijaliznom periodu u odnosu na kontrolnu grupu.
- Biohemijski parametri kojima se prati metabolizam gvožđa (gvožđe, UIBC, TIBC, %Sat i feritin) su promenljivi u ispitivanim grupama.
- Otkrivanje novih markera je važno za preciznije definisanje anemije i mehanizama njenja kod pacijenata na hemodijalizi i u predijaliznom periodu.

4. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 124 ispitanika i to 104 bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom od kojih je 64 bolesnika na hemodijalizi, a 40 bolesnika je u predijaliznom stadijumu. Svi bolesnici sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom primali su eritropoetin i parenteralnu terapiju gvožđem. Inicijalno, rHuEPO-beta aplikovan je tri puta nedeljno u dozi od 50 do 150 IU/kg/nedeljno do postizanja ciljnih koncentracija Hb od 110-120g/L i HCT 33-36%, uz održavanje postignutih vrednosti (srednja doza održavanja <125IU/kg/nedeljno) individualnim pristupom (smanjenjem ili povećavanjem doze na jednom nedeljno do jednom mesečno). Lečenje eritropoetinom prekidano je kada su vrednosti Hb prelazile 130 g/L. U slučaju absolutne (feritin < 100 ng/ml) ili funkcionalne (feritin >100 ng/ml, %Sat<20%) deficijencije gvoždja, primali su intravenski preparat gvoždja, gvožđe i sukroza po protokolu (Dittrich i sar., 2002) u dozi od 100mg tokom deset uzastopnih hemodijaliza. Bolesnici sa serumskim feritinom od 100-800ng/mL i %Sat 20-50% primali su gvožđe intravenski jednom nedeljno tokom deset nedelja. Parenteralna primena gvoždja bila je prekidana kada vrednost serumskog feritina pređe 800ng/mL, sem u slučajevima kada je postojala sumnja na funkcionalni deficit gvoždja (European best practice guidelines, 1999; National Kidney Foundation, 2002).

Kontrolnu grupu činilo je 20 zdravih ispitanika.

Karakteristike ispitivanih grupa:

Ispitivanjem su obuhvaćeni:

1. HD grupa: bolesnici sa hroničnog programa HD koji se dijaliziraju 3 puta nedeljno po 4 h preko polisulfonskih dijalizatora (F6 I F7 HPS, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Nemačka), koriste i bikarbonatne dijalizne rastvorenje i standardnu heparinizaciju,
2. pre HD grupa: pacijenti koji su u zadnjem stadijumu bubrežne bolesti definisani kao 4 (stepen glomerulane filtracije 15-29 mL/min/1.73m²) i 5 (GFR <15 mL/min/1.73m²) stadijum hronične bubrežne insuficijencije,

3. K grupa: kontrolna grupa koju čini zdrava populacija ljudi bez bubrežnih i drugih bolesti.

Grupa bolesnika na hemodijalizi dodatno je podeljena u odnosu na nivo feritina u serumu po sledećim grupama:

1. grupa sa koncentracijom feritina do 100 ng/ml - 6 bolesnika
2. grupa sa vrednostima feritina od 100 do 199 ng/ml- 32 bolesnika
3. grupa sa vrednostima feritina od 200 do 499ng/ml- 36 bolesnika
4. grupa sa vrednostima feritina preko 500ng/ml- 50 bolesnika

Prema Evropskim smernicama dobre kliničke prakse (European best practice guidelines, 1999), za izuzetno avanj anemije, kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, deficijencija anemije je opisana kao osnovni uzrok rezistencije na stimulaciju eritropoeze, bilo da se radi o apsolutnoj (feritin<100 ng/mL i %Sat<20%) ili relativnoj deficijenciji (feritin>100 ng/mL i %Sat <20%). Ovo je ujedno i bio razlog podele HD grupe na četiri podgrupe prema nivou serumskog feritina.

U ispitivanje nisu uključivane osobe: mlađe od 18 godina, sa evidencijom akutne infekcije ili traume u zadnje četiri godine, hepatitis C i B pozitivne, sa evidencijom o paranteralnom primanju preparata gvoždja u zadnjih 14 dana, sa evidencijom o transfuzijama krvi koje su primljene u poslednjih mesec dana, sa hemoglobinopatijom, sa malignitetom, sa nedavno otkrivenim gubitkom krvi i post transplantacijskim statusom.

4.2. Metodologija

Svim ispitanicima je uzeta krv zatvorenim vakuum sistemom. Za hematološke parametre koristile su se epruvete sa anikoagulansom EDTA, a za biohemijske parametre epruvete bez antikoagulansa koje su centrifugirane uz izdvajanje seruma i određeni su sledeći parametri:

1. Parametri krvne slike (Le, Er, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT) na hematološkom autoanalizatoru ADVIA 120 Simens ex Bayer.
2. Opšti biohemijski markeri: glikemija, urea, kreatinin, kalcijum, fosfor, alkalna fosfataza, mokra na kiselina, ukupni proteini, albumini, ukupni holesterol, HDL, LDL, trigliceridi, RISK score, aspartat-transaminaza, alanin-transaminaza, -glutamilttransferaza, i kao marker inflamacije C reaktivni protein (komercijalnim testovima na aparatu Dimension firme Dade Behring Simens).

3. Parametri anemije: folna kiselina, vitamin B12 (komercijalnim testovima na imunoheмиjskom aparatu Cobas e 411 firme Rosch)
4. Parametri metabolizma gvoža:
 - gvože, TIBC, UIBC, saturacija transferina (komercijalnim testovima na aparatu Dimension firme Dade Behring Simens)
 - Feritin (komercijalnim testom na imunoheмиjskom aparatu Cobas e 411 firme Rosch)
 - Hecpidin je odreivan komercijalnom kvantitativnom metodom koja je bazirana na kompetitivnoj inhibiciji, enzim imunoesej tehnikom (ELISA test (ELISA-Enzyme-linked immunosorbent assay) firme DRG (Marburg Germany). Monoklonska antitela specifi na za hepcidin 25 su vezana za površinu mikroplo e. Standardni uzorci se dodaju u okca plo e i u toku inkubacije vezuju za antitela. U okca se dodaju pufer i hepcidin-biotin konjugat (enzim konjugat) i endogeni hepcidin uzoraka pacijenta se po principu kompetativne inhibicije "takmi i" sa dodatim konjugatom za vezivanje na obložena antitela. Nakon inkubacije nevezani konjugat se uklanja ispiranjem. Dodaje se zatim enzim kompleks (streptavidin-peroksidaza enzim kompleks) i nakon inkubacije sa ovim jedinjenjem vrši se ispiranje po drugi put. Dodavanjem rastvora supstrata dolazi do promene boje koja se zaustavlja nakon kratke inkubacije. Zaustavljanje razvijanja boje se vrši 2N sumpornom kiselinom. Intenzitet boje se zatim ita na talasnoj dužini od 450nm, a dobijene vrednosti su obrnuto srazmerane koncentraciji hepcidina u uzorku (koli ina vezanog hepcidina u inicijalnoj reakciji), a dobijene vrednosti su izražene u ng/mL.
 - Koncentracija rastvorljivog receptora transferina odreivana je nefelometrijski na analizatoru BN-II firme Dade Behring, GMBH, Marburg, Nema ka. Polistiren partikule obložene monoklonalnim antitelima na humane rastorljive receptore agregirale su se nakon mešanja sa uzorcima koji sadrže sTfR. Ovi agregati rasipaju snopove svetlosti koja prolazi kroz uzorke. Intenzitet rasute svetlosti je proporcionalan koncentraciji sTfR u uzorku. Rezultati su uporeivani sa standardom poznate koncentracije. Koncentracije sTfR u serumu izražavane su u mg/l.

4.3. Mesto i vreme ispitivanja

Istraživanje je obavljeno u Klini ko-biohemijskoj laboratoriji Vojne bolnice Niš, na Klinici za nefrologiju i hemodijalizu Klini kog centra Niš (na odeljenju hemodijalize i laboratoriji Klinike) i u specijalizovanoj biohemijskoj laboratoriji Neolab koja je akreditovana za odre ivanje.

4.4 Statisti ka obrada podataka

Statisti ka analiza je sprovedena na ra unaru koriš enjem Excel programa iz Microsoft Office programskog paketa i SPSS programa u verziji 10.0. U svim analizama je kao granica statisti ke zna ajnosti podrazumevana greška procene od 0,05 ili 5%.

Prikazivani su slede i statisti ki parametri: aritmeti ka sredina (\bar{X}), standardna devijacija (SD), medijana, minimalna i maksimalna vrednost, indeks strukture (%) i 95% interval poverenja (95% IP).

Pore enje srednjih vrednosti numeri kih obeležja izme u dve grupe ispitanika vršeno je Studentovim t testom ili Man-Vitni U testom (Mann-Whitney U test), kada distribucija vrednosti nije ispunjavala zahteve normalnog rasporeda. Pore enje srednjih vrednosti numeri kih obeležja izme u više od dve grupe ispitanika vršeno je analizom varijanse (ANOVA) i sledbenim Danetovim testom (Dunnet post hoc test) ili Kruskal Wallis testom kao neparametrijskom anovom.

Za procenu medusobne povezanosti i uticaja faktora koriš ena je korelaciona i regresiona analiza. Izra unavane su vrednosti aproksimativnog relativnog rizika (odds ratio - OR) i njihovih 95% intervala poverenja (95% IP).

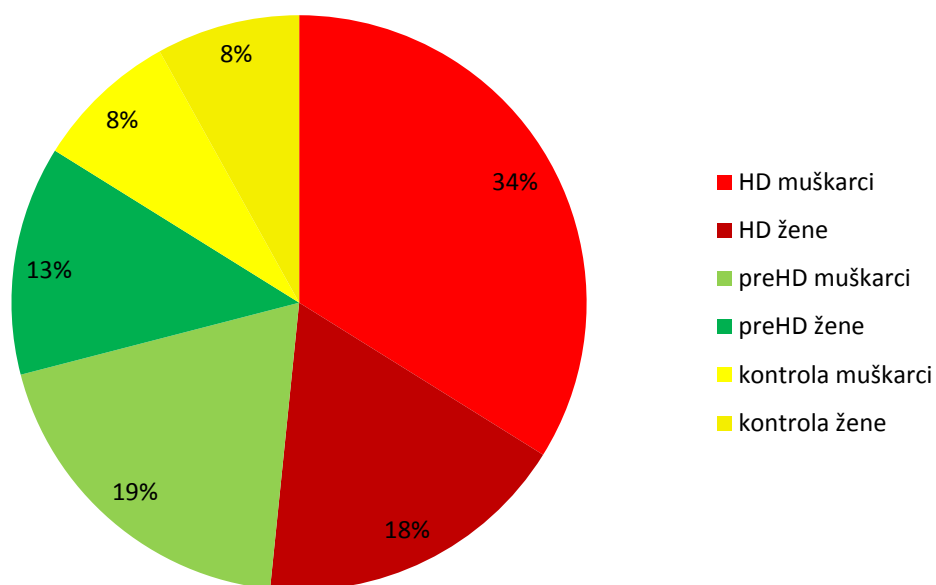
Odre ivanje grani nih (cut-off) vrednosti feritina i hepcidina, a na osnovu zadovoljavaju e ili nedovoljne saturacije, vršeno je ROC (Receiver operating characteristics) analizom. Kao grani ne vrednosti definisane su one vrednosti kod kojih je zbir senzitivnosti i specifi nosti najve i.

Rezultati statisti ke analize prikazani su tabelarno i grafi ki.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa

Istraživanjem je obuhvaćeno 124 ispitanika i to 104 bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom od kojih je 64 bolesnika na hemodijalizi, a 40 bolesnika je u predijaliznom stadijumu. Kontrolnu grupu činilo je 20 zdravih ispitanika. Od ukupno obrađena 124 ispitanika, muškarci su bili zastupljeni u 69%, a žene u 31%. Polna struktura ispitanika prikazana je na grafikonu 1.



Grafikon broj 1. Prikaz strukture ispitanika prema polu

Ispitivane grupe se nisu razlikovale po polu i prosečnoj starosti bolesnika.

Osnovne demografske karakteristike ispitivanih grupa prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Osnovne demografske karakteristike ispitanika

	HD		pre HD		Kontrola	
	žene	muškarci	žene	muškarci	žene	muškarci
n / %	22 / 34	42 / 66	16 / 40	24 / 60	10 / 50	10 / 50
Starost (god)	63,6±5,9	62,9±6,1	65,4±3,4	64,8±6,0	62,8±5,6	63,6±6,2
Trajanje bubrežne bolesti (god)	5,15±6,0	8,8±6,3	9,7±3,6	6,3±3,4	-	-
Trajanje hemodijalize (god)	4,86±2,6	6,7±5,4	-	-	-	-
GRF (ml/min./1.73 m ²)	2±0,78	3±1,1	41,2±14,1	42,5±16,5	124,4±8,1	126,1±9,5
Hipertenzija n (%)	20 (90)	36 (86)	4 (66)	19 (56)	5 (50)	7 (70)
Pušenje n (%)	2(10)	4 (9)	7 (44)	3 (16)	3 (30)	4 (40)
Sistolni TA (mmHg)	131,1±17,1	130,2±7,3	124,3±12,1	140,1±1,6	128,3±10,1	132,1±12,3
Dijastolni TA (mmHg)	80,6±11,3	80±5,5	86±8,9	89,5±7,8	82±6,9	84,1±8,5

GRF-ja ina glomerularne filtracije; TA-krvni pritisak; Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD ili kao broj(%).

Osnovne biohemijske karakteristike ispitivanih grupa prikazane su Tabeli 5.

Tabela 5. Osnovne biohemijske karakteristike ispitanika

	HD	preHD	kontrola	p(ANOVA)
Urea (mmol/L)	31,12±5,82 ^b	25,44±5,79 ^{+b}	4,60±1,16 ^b	0,0001
Kreatinin (umol/L)	1067,79±258,71 ^b	419,40±103,76 ^{+b}	71,88±11,76 ^b	0,0001
Proteini (g/L)	58,42±5,45 ^{+b}	65,50±9,77 ^b	72,080±2,98 ^b	0,0001
Albumini (g/L)	29,96±4,27 ^{+b}	34,82±6,13 ^b	41,92±2,18 ^b	0,0001
Glukoza (mmol/L)	5,73±1,71 [*]	4,65±0,31 ^b	5,17±0,67	0,0001
Na (mmol/L)	137,83±3,19	139,15±3,59 ^a	137,5±2,91	0,05
K (mmol/L)	5,27±0,51	5,19±0,71	4,11±0,34 ^b	0,0001
AST (U/L)	18,47±7,92	19,70±5,37	21,45±5,85 ^b	0,01
ALT (U/L)	32,95±9,81	34,25±7,93	39,70±7,46 ^b	0,01
Bilirubin (umol/L)	7,73±2,89 ^b	5,66±1,59 ^{+b}	10,68±2,69 ^b	0,0001
CRP (mg/L)	7,31±2,36 ^b	3,10±2,13 ^{+b}	1,79±0,64 ^b	0,0001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD, Na-natrijum, K-kalijum, AST-alanin transferaza, AST-aspartat transferaza, CRP-C reaktivni protein, Independent Samples t Test *p<0,0001 u odnosu na pre HD grupu, Mann-Whitney U test + p<0,0001 u odnosu na HD grupu, p(ANOVA) ^a pre HD u odnosu na kontrolnu grupu, ^b u odnosu na ostale grupe.

Ispitanici na hemodijalizi imali su statisti ki zna ajno više vrednosti ureje, kreatinina, glukoze i bilirubina u odnosu na predijaliznu grupu ($p < 0,0001$). Koncentracije proteina i albumina zna ajno su niže u dijaliznoj u odnosu na predijaliznu grupu ($p < 0,0001$). Nije prona ena statisti ki zna ajna razlika u vrednostima Na, K, AST i ALT izme u hemodijalizne i predijalizne grupe. Vrednosti CRP kao markera inflamacije pokazale su statisti ki zna ajnu razliku izme u HD i pre HD grupe ispitanika ($p < 0,0001$) (Tabela 5).

Ura ena ANOVA analiza pokazala je da su vrednosti uree, kreatinina i CRP najve e u HD grupi, zna ajno manje u pre HD grupi i najmanje u kontrolnoj grupi ($p < 0,0001$). Najniže su vrednosti proteina i albumina u HD grupi, zna ajno više u pre HD grupi, a najviše u kontrolnoj grupi ispitanika ($p < 0,0001$). Vrednosti glukoze su najniže u pre HD grupi u odnosu na ostale grupe ispitivanih bolesnika ($p < 0,0001$). Vrednosti Na su ve e u preHD grupi u odnosu na kontrolnu grupu bolesnika ($p < 0,05$). Vrednosti K su najniže u kontrolnoj grupi u odnosu na ostale grupe pacijenata sa HBI. Vrednosti bilirubina su najviše u kontrolnoj grupi, zna ajno niže u HD, a najniže u pre HD grupi (Tabela 5).

Lipidni parametri ispitanika prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Lipidni parametri ispitanika

	HD	preHD	kontrola	p(ANOVA)
Trigliceridi (mmol/L)	1,84±1,15	1,67±0,85	1,56±1,36	0,3
Holesterol (mmol/L)	3,91±0,94 ^{*b}	5,59±1,51	5,15±0,63	0,0001
LDL-C (mmol/L)	2,54±0,67 ^{*b}	3,42±0,96	3,36±0,48	0,0001
HDL-C (mmol/L)	1,12±0,28	0,94±0,47 ⁺	1,52±0,36 ^b	0,0001
Risk skor	3,62±1,09 [*]	4,78±1,00 ^b	3.30±0.62	0,0001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD, Independent Samples t Test ^{*} $p < 0,0001$ u odnosu na pre HD grupu, Mann-Whitney U test ⁺ $p < 0,001$ u odnosu na HD grupu, p(ANOVA) ^b u odnosu na ostale grupe.

Koncentracije lipidnih parametara pokazuju signifikantnu statisti ku zna ajnost izme u HD i pre HD grupe. Srednja vrednost holesterola, LDL-a i risk skora su statisti ki zna ajno niže u hemodijaliznoj u odnosu na predijaliznu grupu ($p < 0,0001$), dok su koncentracije HDL-a statisti ki zna ajno niže u pre HD grupi u odnosu na HD grupu ispitanika. (Tabela 6).

Komparativnom analizom (ANOVA) na ena je statisti ki signifikantno niža vrednost holesterola i LDL-a u HD grupi u odnosu na ispitivane grupe. Koncentracije HDL-a su statisti ki zna ajno najviše u kontrolnoj grupi u odnosu na ostale grupe

ispitanika. Risk skor pokazuje statistički značajno najviše vrednosti u pre HD grupi u odnosu na ostale grupe (Tabela 6).

5.2. Parametri anemijskog sindroma ispitanika

Osnovni hematološki parametri ispitanika prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Osnovni hematološki parametri ispitanika

	HD	preHD	kontrola	p(ANOVA)
Le ($\times 10^9$ /uL)	8,99 \pm 2,318 ^b	6,84 \pm 2,65 ⁺	6,08 \pm 1,47	0,0001
Er ($\times 10^{12}$ /uL)	2,58 \pm 0,59 ^{*b}	3,54 \pm 0,32 ^b	4,92 \pm 0,23 ^b	0,0001
Hb (g/L)	97,70 \pm 20,19 ^{*b}	111,90 \pm 3,75 ^b	151,00 \pm 6,74 ^b	0,0001
HCT (%)	29,57 \pm 5,87 ^{*b}	33,42 \pm 1,22 ^b	40,43 \pm 8,81 ^b	0,0001
MCV (fL)	76,82 \pm 4,61 ^{*b}	90,29 \pm 2,02 ^b	94,58 \pm 2,16 ^b	0,0001
MCH (pg)	23,77 \pm 1,76 ^{*b}	30,03 \pm 0,77 ^b	31,55 \pm 4,81 ^b	0,001
MCHC (g/L)	310,80 \pm 15,78 ^{*b}	338,08 \pm 5,66 ^b	359,75 \pm 10,46 ^b	0,0001
Trombociti (10^9 /L)	187,73 \pm 56,86	210,05 \pm 85,01	272,50 \pm 40,33 ^b	0,0001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, Le-broj leukocita, Er-broj eritrocita, Hb-koncentracija hemoglobina, HCT-hematokrit, MCV-srednja zapremina eritrocita, MCH-koncentracija hemoglobina po jedinici zapremine eritrocita, MCHC-srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu, Independent Samples t Test * $p < 0,0001$ u odnosu na pre HD grupu, Mann-Whitney U test ⁺ $p < 0,001$ u odnosu na HD grupu, p(ANOVA) ^b u odnosu na ostale grupe.

Osnovni hematološki parametri pokazali su statistički značajne razlike između HD i pre HD grupe bolesnika. Broj Le ($p < 0,001$), pokazuje statistički značajno više vrednosti u HD u odnosu na pre HD grupu. Broj Er, koncentracija Hb i HCT, MCV, MCHC ($p < 0,0001$) i MCH ($p < 0,001$) pokazuju statistički značajno niže vrednosti u HD grupi u odnosu na pre HD grupu ($p < 0,0001$) (Tabela 7).

Urađena ANOVA analiza pokazala je da su u HD grupi vrednosti Le statistički značajno više u odnosu na ostale grupe bolesnika ($p < 0,0001$). Broj trombocita je statistički značajno viši u kontrolnoj grupi u odnosu na ostale grupe pacijenata. Analize hematološkog statusa kao što je broj Er, Hb, HCT, MCV, MCH i MCHC su imale statistički značajne razlike u ispitivanim grupama, i to najniže vrednosti u HD grupi, više u pre HD grupi, a najviše u kontrolnoj grupi ($p < 0,0001$) (Tabela 7).

5.3. Parametri metabolizma gvož a ispitanika

Osnovni biohemijski parametri metabolizma gvož a prikazani su u Tabeli 8.

Tabela 8. Osnovni biohemijski parametri metabolizma gvož a

	HD	preHD	kontrola	p(ANOVA)
Fe (umol/L)	16,56±7,19 ^b	20,73±2,02 ^{++b}	24,13±5,27 ^b	0,0001
UIBC (umol/L)	19,34±11,06 ^b	24,35±4,74 ⁺	23,67±7,33	0,05
TIBC (umol/L)	39,64±8,96	40,54±5,61	47,90±6,43 ^b	0,0001
% Sat	38,14±21,92	42,78±7,13	52,96±12,29 ^b	0,001
Feritin (ng/mL)	1130,68±982,23 ^b	332,01±168,79 ^{++b}	173,13±96,14 ^b	0,0001
sTfR (mg/L)	2,46±0,53 ^{*b}	2,01±0,22 ^b	1,10±0,25 ^b	0,0001
Hepcidin (ng/mL)	82,22±32,27 ^b	60,34±6,26 ^{++b}	40,95±9,69 ^b	0,0001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD, Fe-serumska koncentracija gvož a, UIBC- nezasi eni kapacitet za vezivanje gvož a, TIBC-ukupni kapacitet za vezivanje gvož a, %sat – procenat saturacije transferina, sTfR- Koncentracija solubilnih transferinskih receptora. Independent Samples t Test *p<0,0001 u odnosu na pre HD grupu, Mann-Whitney U test ⁺ p<0,01, ⁺⁺ p<0,001 u odnosu na HD grupu, p(ANOVA) ^b u odnosu na ostale grupe,

Ispitanici na hemodijalizi imali su statisti ki signifikantno nižu koncentraciju serumskog Fe (p<0,001) i UIBC (p<0,01) u odnosu na predijalizne bolesnike. Vrednosti feritina (p<0,001), sTfR (p<0,0001) i hepcidina (p<0,001) su statisti ki zna ajno više u HD u odnosu na pre HD grupu (Tabela 8).

Komparativnom analizom (ANOVA) na ena je statisti ki signifikantno niža vrednost UIBC u HD grupi u odnosu na ostale grupe, dok su vrednosti TIBC i % Sat statisti ki signifikantno najviše u kontrolnoj grupi u odnosu na grupe bolesnika sa HBI. Koncentracija serumskog Fe bila je statisti ki signifikantno najniža u HD grupi, viša u pre HD grupi i najviša u kontrolnoj grupi (p<0,001). Vrednosti feritina, sTfR i hepcidina bile su statisti ki signifikantno najviše u HD grupi, niže u pre HD, a najniže u kontrolnoj grupi (p<0,001) (Tabela 8).

Vrednosti vitamina B12 i folne kiseline prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Vrednosti vitamina B12 i folne kiseline

	HD	preHD	kontrola	p(ANOVA)
Vitamin B ₁₂ (pmol/L)	486,35±244,25	468,98±137,69	359,60±90,01	NS
Folna kis. (nmol/L)	17,62±12,80	17,56±2,74	20,70±7,06 ^b	0,0001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD, p(ANOVA) ^b u odnosu na ostale grupe,

Vrednosti vitamina B₁₂ i folne kiseline nisu se statisti ki zna ajno razlikovale me u grupama bolesnika sa HBI. Ura ena ANOVA analiza pokazala je zna ajno više vrednosti folne kiseline u kontrolnoj grupi u odnosu na ostale grupe bolesnika (p<0,001).

5.4. Korelacija zna ajnih anemijskih parametara ispitanika

Primenom Pearsonovog korelacionog testa ispitivana je korelacija zna ajnih parametara anemijskog sindroma u svim ispitivanim grupama.

Tabela 10. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u HD grupi

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT	
	r	p	r	p	r	p
Hb	0,888	0,0001**				
HCT	0,935	0,0001**	0,944	0,0001**		
TIBC	0,257	0,05*	0,263	0,05*	0,22	0,08

r-Pearsonov koeficijent korelacije, * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$

Kod bolesnika na hemodijalizi postoji statisti ki zna ajno pozitivna korelacija broja Er sa koncentracijom Hb ($p < 0,0001$), HCT ($p < 0,0001$) i TIBC ($p < 0,05$), kao i zna ajno pozitivna korelacija koncentracije Hb sa HCT ($p < 0,0001$) i TIBC ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 11. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u pre HD grupi

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT	
	r	p	r	p	r	p
Hb	0,470	0,001*				
HCT	0,615	0,0001**	0,721	0,0001**		
TIBC	0,015	0,925	0,138	0,258	0,174	0,283

r-Pearsonov koeficijent korelacije, * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$

Pearsonovog korelacioni test kod predijaliznih bolesnika pokazao je statisti ki zna ajnu pozitivnu korelaciju broja Er sa koncentracijom Hb ($p < 0,001$) i HCT ($p < 0,0001$), kao i pozitivnu korelaciju koncentracije Hb sa HCT ($p < 0,0001$) (Tabela 11).

Tabela 12. Prikaz korelacija anemijskog sindroma u kontrolnoj grupi

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT	
	r	p	r	p	r	p
Hb	0,716	0,0001***				
HCT	0,537	0,001**	0,538	0,01*		
TIBC	-0,137	0,564	-0,356	0,124	-0,154	0,518

r-Pearsonov koeficijent korelacije, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

U kontrolnoj grupi ispitanika Pearsonov korelacioni test pokazao je statisti ki zna ajnu pozitivnu korelaciju broja Er sa koncentracijom Hb ($p < 0,0001$) i HCT ($p < 0,001$), kao i zna ajnu pozitivnu korelaciju koncentracije Hb sa HCT ($p < 0,01$) (Tabela 12).

5.5. Korelacija značajnih parametara metabolizma gvožđ a ispitanika

Tabela 13. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvožđ a kod bolesnika na hemodijalizi

Parametri	Korelacija sa Fe		Korelacija sa %Sat		Korelacija sa feritinom		Korelacija sa hepcidinom	
	r	p	r	p	r	p	r	p
%Sat	0,876	0,0001**						
Feritin	0,593	0,0001**	0,716	0,0001**				
Hepcidin	0,515	0,0001**	0,567	0,0001**	0,609	0,0001**		
sTfR	-0,502	0,0001**	-0,847	0,0001**	-0,371	0,001*	-0,478	0,0001**

r-Pearsonov koeficijent korelacije, *p<0,001, ** p<0,0001

Parametri metabolizma gvožđ a kod bolesnika na hemodijalizi pokazali su statisti ki značajnu pozitivnu korelaciju koncentracije serumskog Fe sa procentom saturacije, feritinom i hepcidinom, kao i statisti ki značajnu pozitivnu korelaciju %Sat sa koncentracijom feritina i hepcidina. Vrednosti koncentracije feritina su statisti ki značajno pozitivno korelirale sa hepcidinom (p<0,0001). Koncentracija sTfR pokazuje statisti ki značajno negativnu korelaciju sa vrednostima koncentracije serumskog Fe, hepcidina (p<0,0001), feritina (p<0,001) i %Sat (p<0,0001) (Tabela 13).

Tabela 14. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvožđ a kod predijaliznih bolesnika

Parametri	Korelacija sa Fe		Korelacija sa %Sat		Korelacija sa feritinom		Korelacija sa hepcidinom	
	r	p	r	p	r	p	r	p
%Sat	0,724	0,0001***						
Feritin	0,374	0,001**	0,396	0,01*				
Hepcidin	0,355	0,01*	0,487	0,001**	0,755	0,0001***		
sTfR	-0,524	0,001**	0,405	0,001**	-0,551	0,0001***	-0,254	0,127

r-Pearsonov koeficijent korelacije, *p<0,01, **p<0,001, *** p<0,0001

Kod predijaliznih bolesnika koncentracije serumskog Fe su statisti ki značajno pozitivno korelirale sa procentom saturacije (p<0,0001), feritinom (p<0,001) i hepcidinom (p<0,01). Procenat saturacije je značajno pozitivno korelirao sa vrednostima koncentracije feritina (p<0,01), hepcidina (p<0,001) i sTfR (p<0,001). Vrednosti koncentracije feritina su značajno pozitivno korelirale sa vrednostima koncentracije hepcidina (p<0,0001). Koncentracija sTfR je statisti ki značajno negativno korelirala sa vrednostima koncentracije Fe (p<0,001) i feritina (p<0,001) (Tabela 14).

Tabela 15. Prikaz korelacija parametara metabolizma gvoža kod kontrolne grupe

Parametri	Korelacija sa Fe		Korelacija sa %Sat		Korelacija sa feritinom		Korelacija sa hepcidinom	
	r	p	r	p	r	p	r	p
%sat	0,575	0,001*						
Feritin	0,029	0,903	0,280	0,001*				
Hepcidin	0,176	0,456	0,253	0,283	0,785	0,0001**		
sTfR	0,129	0,578	-0,262	0,264	-0,004	0,987	-0,021	0,93

r-Pearsonov koeficijent korelacije, *p<0,001, ** p<0,0001

Kod kontrolne grupe ispitanika vrednosti koncentracije serumskog Fe su statisti ki zna ajno pozitivno korelirale sa procentom saturacije (p<0,001), a vrednosti procenata saturacije su statisti ki zna ajno pozitivno korelirale sa vrednostima koncentracije feritina (p<0,001). Vrednosti koncentracije feritina su statisti ki zna ajno pozitivno korelirale sa vrednostima koncentracije hepcidina (p<0,0001) (Tabela 15).

5.6. Korelacija zna ajnih anemijskih parametara i parametara metabolizma gvoža kod ispitanika

Tabela 16. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvoža kod HD grupe

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT		Korelacija sa TIBC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Fe	0,127	0,319	0,145	0,254	0,115	0,364	0,257	0,05*
% Sat	0,124	0,328	0,157	0,214	0,128	0,315	0,128	0,314
Feritin	0,115	0,367	0,109	0,393	0,160	0,404	0,014	0,405
Hepcidin	0,082	0,520	0,024	0,853	0,035	0,781	0,145	0,23
sTfR	0,002	0,986	-0,012	0,923	0,086	0,497	0,85	0,086

r-Pearsonov koeficijent korelacije, *p<0,05

U grupi pacijenata na hemodijalizi Pearsonov korelacioni test pokazao je statisti ki zna ajnu pozitivnu korelaciju koncentracije Fe sa TIBC (p<0,05) (Tabela 16).

Tabela 17. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvoža kod pre HD grupe

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT		Korelacija sa TIBC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Fe	0,234	0,146	0,199	0,218	-0,092	0,234	0,157	0,125
% Sat	0,066	0,686	-0,258	0,108	-0,071	0,066	0,014	0,405
Feritin	0,197	0,270	-0,093	0,570	0,088	0,197	0,145	0,231
Hepcidin	0,271	0,09	-0,094	0,563	0,1	0,539	0,154	0,324
sTfR	-0,418	0,001*	-0,140	0,390	-0,295	0,065	0,08	0,086

r-Pearsonov koeficijent korelacije, *p<0,001

U grupi predijaliznih pacijenata Pearsonov korelacioni test pokazao je statistički značajnu negativnu korelaciju broja Er sa vrednostima koncentracije sTfR ($p < 0,001$) (Tabela 17).

Tabela 18. Prikaz korelacija anemijskih i parametara metabolizma gvožđa kod kontrolne grupe

Parametri	Korelacija sa Er		Korelacija sa Hb		Korelacija sa HCT		Korelacija sa TIBC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Fe	0,368	0,11	0,234	0,321	0,378	0,1	0,22	0,53
% Sat	0,657	0,001**	0,491	0,01*	0,484	0,01*	0,254	0,364
Feritin	0,223	0,364	0,158	0,506	0,369	0,11	0,154	0,254
Hepcidin	0,062	0,794	-0,022	0,926	0,465	0,01*	0,052	0,824
sTfR	-0,280	0,233	-0,261	0,266	-0,262	0,264	0,121	0,129

r-Pearsonov koeficijent korelacije, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

U kontrolnoj grupi Pearsonov korelacioni test pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju % Sat sa brojem Er ($p < 0,001$), koncentracijom Hb i HCT ($p < 0,01$), kao i vrednosti koncentracije hepcidina sa HCT ($p < 0,01$) (Tabela 18).

Tabela 19. Parametri metabolizma gvožđa u grupi pacijenata sa različitim koncentracijama feritina

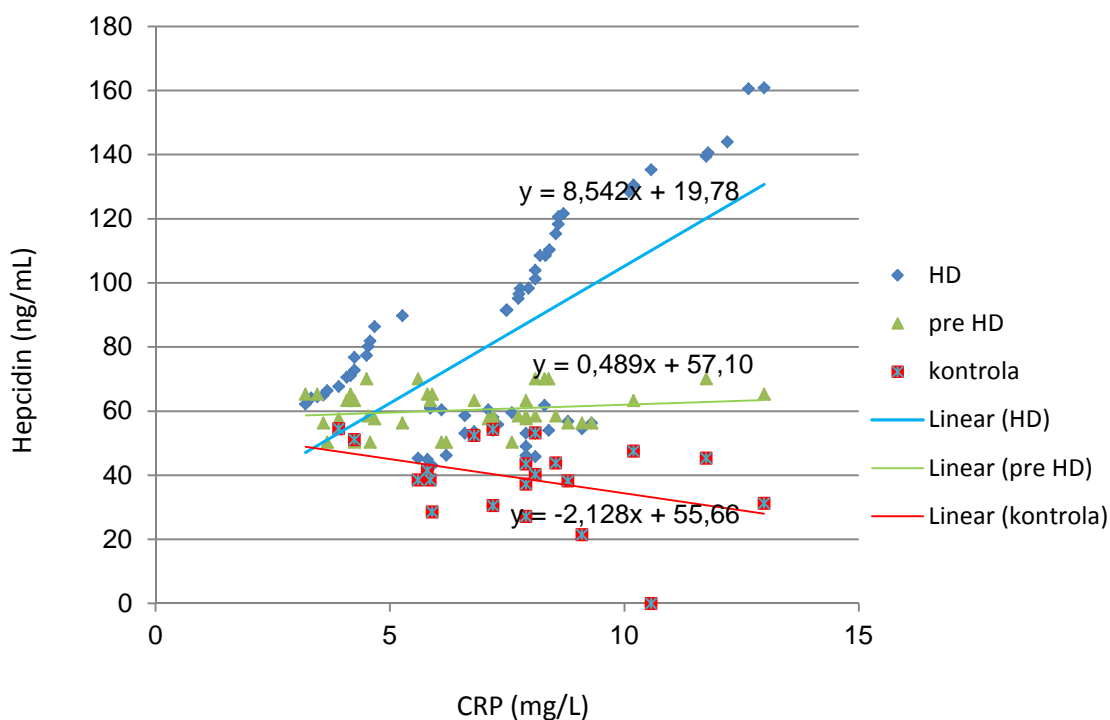
	<100	100-199	200-499	>500	p(ANOVA)
broj	6	32	36	50	
Feritin (ng/mL)	53,32±15,99 ^c	159,21±24,56 ^c	356,79±98,49 ^c	1416,95±933,92 ^c	0,0001 ⁺
Fe(umol/L)	21,59±6,26	19,77±4,68	18,56±6,72	18,83±7,03	0,66
TIBC(umol/L)	50,06±8,46 ^c	41,16±7,76	42,06±7,22	39,70±8,43	0,01
UIBC(umol/L)	27,41±9,27 ^c	22,53±6,61	23,57±7,90	19,02±10,74	0,05 ⁺
%Sat	42,35±19,35	41,10±9,93	38,99±15,68	47,32±21,42	0,149
Hepcidin (ng/mL)	83,23±13,76 ^c	54,17±8,69	58,85±8,91	88,85±33,39 ^c	0,0001 ⁺
sTfR(mg/L)	2,27±0,48 ^a	2,08±0,74	1,97±0,62	1,38±0,59	0,01 ⁺
CRP (mg/L)	2,95±2,12	2,20±2,05	3,98±1,88	7,92±2,05 ^c	0,0001 ⁺

p(ANOVA) ^a u odnosu na grupu >500, ^b u odnosu na grupu <100, ^c u odnosu na ostale grupe,

⁺Kruskal Wallis test

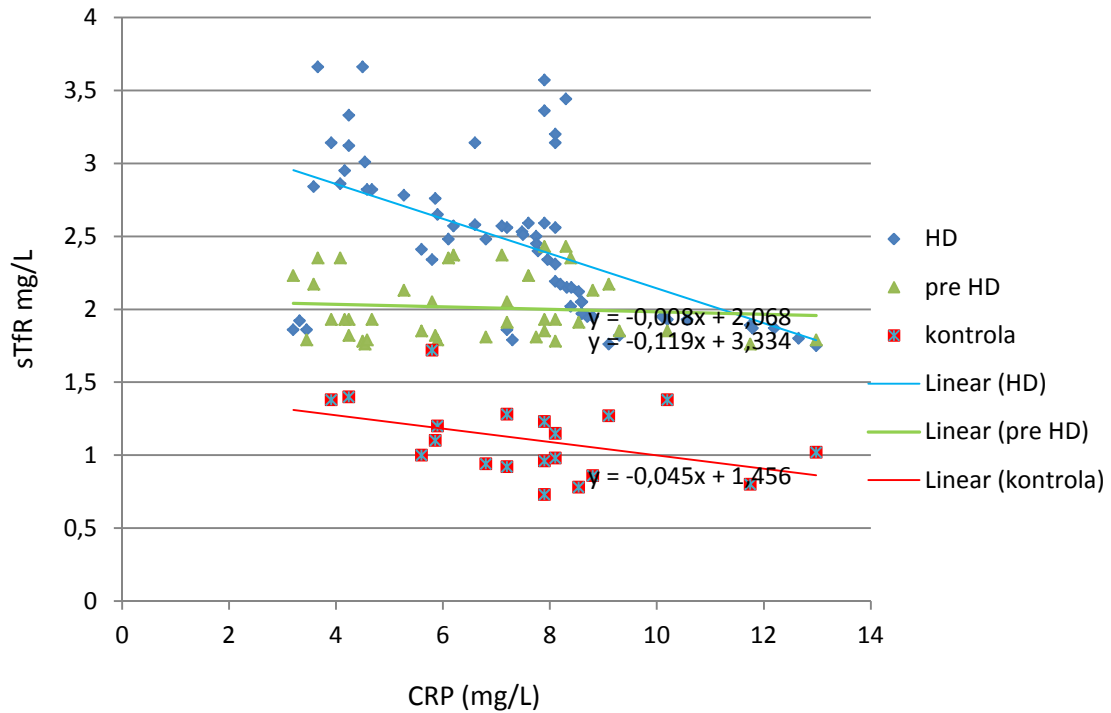
Komparativnom analizom (ANOVA) i Kruskal Wallis-ovim testom kod pacijenata na hemodijalizi i različitim feritinskim grupama nađena je statistički značajno viša vrednost TIBC ($p < 0,01$) i UIBC ($p < 0,05$) u grupi feritina <100 ng/mL u odnosu na ostale feritinske grupe. Vrednosti koncentracije hepcidina su statistički značajno najviše u grupi feritina <100 ng/mL i >500 ng/mL u odnosu na grupe bolesnika sa vrednostima feritina 100-199 ng/mL i 200-499 ng/mL ($p < 0,001$). Vrednosti koncentracije sTfR su statistički značajno veće u grupi feritina <100 ng/mL u odnosu na grupu feritina >500

ng/mL ($p < 0.01$). Vrednosti CRP su statisti ki zna ajno najviše u grupu feritina >500 ng/mL u odnosu na ostale feritinske grupe ($p < 0.001$) (Tabela 19).



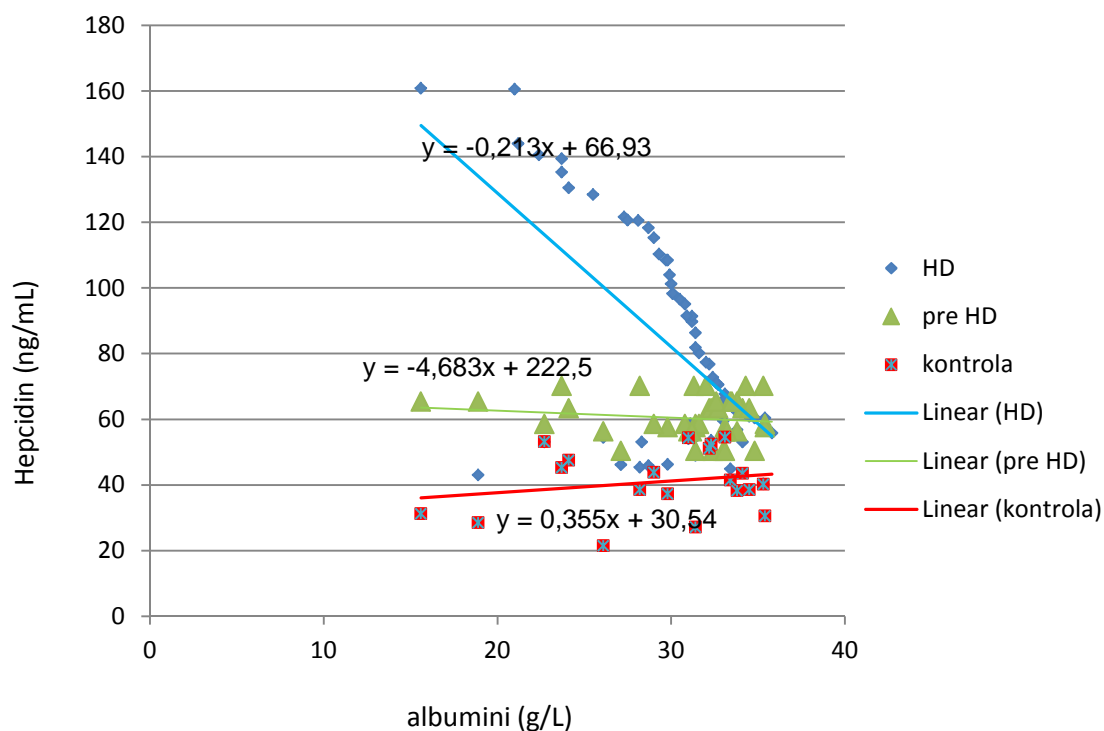
Grafikon 2. Povezanost vrednosti koncentracije hepcidina sa vrednostima CRP

Ura ena korelaciona analiza pokazuje zna ajnu pozitivnu povezanost vrednosti koncentracije hepcidina sa vrednostima CRP u grupama bolesnika sa HBI, a kod zdravih ispitanika je postojala negativna povezanost (Grafikon 2). Ura ena korelaciona analiza Pearson-ovim testom korelacije pokazuje jaku pozitivnu i statisti ki zna ajnu korelaciju izme u vrednosti koncentracije hepcidina i vrednosti CRP u HD grupi ($C=0,62$) i pre HD grupi ($C=0,60$). Ova povezanost je slabo negativna i bez statisti kog zna aja u kontrolnoj grupi ($C=-0,14$).



Grafikon 3. Povezanost vrednosti koncentracije sTfR sa vrednostima CRP

Ura ena korelaciona analiza pokazuje zna ajnu negativnu povezanost vrednosti koncentracije sTfR sa vrednostima CRP u grupama bolesnika sa HBI, dok je kod zdravih ispitanika prisutna pozitivna povezanost (Grafikon 3). Ura ena korelaciona analiza Pearson-ovim testom korelacije pokazuje jaku negativnu i statisti ki zna ajnu korelaciju izme u vrednosti koncentracije sTfR i vrednosti CRP u HD grupi ($C=-0,63$) i pre HD grupi ($C=-0,73$). Ova povezanost je slabo pozitivna i bez statisti kog zna aja u kontrolnoj grupi ($C=0,05$).



Grafikon 4. Povezanost vrednosti koncentracije hepcidina i albumina

Ura ena korelaciona analiza pokazuje zna ajnu negativnu povezanost vrednosti koncentracije hepcidina sa vrednostima koncentracije albumina u grupama bolesnika sa HBI. Kod zdravih ispitanika postoji pozitivna povezanost izme u ova dva parametra (Grafikon 4). Ura ena korelaciona analiza Pearson-ovim testom korelacije pokazuje jaku negativnu i statisti ki zna ajnu korelaciju izme u vrednosti koncentracije hepcidina i albumina u HD grupi ($C=-0,61$) i pre HD grupi ($C=-0,62$). Ova povezanost je slabo pozitivna i bez statisti kog zna aja u kontrolnoj grupi ($C=0,19$).

5.7. Prediktori poreme aja metabolizma gvož a

U cilju odre ivanja povezanosti parametara za postojanje poreme aja metabolizma gvož a, kao i njegovu predikciju primenjena je multivarijantna analiza odnosno logisti ki regresioni model.

U ovom modelu analizirani su podaci svih pacijenata sa HBI, kao i kontrolne grupe. Kao potencijalni parametri uklju ene su slede e nezavisne promenljive: Er, Hb, HCT, TIBC, %Sat, feritin, hepcidin, sTfR i Fe.

Tabela 20. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi

		Zavisna varijabla		
		Hepcidin (ng/mL)		
		R	B	p
P	Er	0,693	8,659	0,581
	Hb	0,693	-0,726	0,156
	HCT	0,693	1,446	0,535
	TIBC	0,693	0,190	0,623
	% Sat	0,693	0,238	0,509
	Feritin	0,693	1,218E-02	0,014*
	sTfR	0,693	-16,466	0,032*
	Fe	0,693	0,155	0,869

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *p<0,01

Na osnovu ovako definisanih parametara u grupi bolesnika na hemodijalizi utvrđeno je da su vrednosti koncentracije feritina i sTfR najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije hepcidina (Tabela 20).

Tabela 21. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika

		Zavisna varijabla		
		Hepcidin (ng/mL)		
		R	B	p
P	Er	0,87	5,675	0,029*
	Hb	0,87	-3,641E-02	0,874
	HCT	0,87	0,190	0,813
	TIBC	0,87	-6,816E-02	0,543
	% Sat	0,87	0,287	0,028*
	Feritin	0,87	3,055E-02	0,0001***
	sTfR	0,87	13,180	0,001**
	Fe	0,87	-3,167E-02	0,949

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *p<0,01, ** p<0,001, *** p<0,0001

U grupi predijaliznih bolesnika broj Er, vrednosti %sat, feritin i koncentracija sTfR su bili najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije hepcidina (tabela 21).

Tabela 22. Multipla regresija zavisne varijable hepcidina u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi

		Zavisna varijabla		
		Hepcidin (ng/mL)		
		R	B	p
P	Er	0,904	-0,775	0,943
	Hb	0,904	-0,601	0,085
	HCT	0,904	0,405	0,064
	TIBC	0,904	-0,615	0,127
	% Sat	0,904	-0,279	0,292
	Feritin	0,904	6,791E-02	0,001**
	sTfR	0,904	-4,027	0,496
	Fe	0,904	0,834	0,108

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, ** p<0,001

U kontrolnoj grupi vrednosti koncentracije feritina su bile najzna ajniji nezavisni prediktor vrednosti koncentracije hepcidina (Tabela 22).

Tabela 23. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi

		Zavisna varijabla		
		Feritin (ng/mL)		
		R	B	p
P	Er	0,774	-37,176	0,929
	Hb	0,774	-6,558	0,634
	HCT	0,774	22,635	0,717
	TIBC	0,774	15,718	0,125
	% Sat	0,774	33,535	0,0001***
	Hepcidin	0,774	8,682	0,01*
	Fe	0,774	-24,976	0,316
	sTfR	0,774	57,993	0,782

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *p<0,01, *** p<0,0001

Procenat saturacije i vrednost koncentracije hepcidina u grupi bolesnika na hemodijalizi su najzna ajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije feritina (Tabela 23).

Tabela 24. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika

		Zavisna varijabla		
		Feritin (ng/mL)		
P		R	B	p
	Er	0,877	-118,068	0,087
	Hb	0,877	-2,149	0,721
	HCT	0,877	0,110	0,996
	TIBC	0,877	1,063	0,718
	% Sat	0,877	-4,479	0,203
	Hepcidin	0,877	20,982	0,0001***
	Fe	0,877	-0,736	0,955
	sTfR	0,877	-409,271	0,0001***

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *** p<0,0001

Vrednosti koncentracije hepcidina i sTfR u predijaliznoj grupi bili su najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije feritina (Tabela 24).

Tabela 25. Multipla regresija zavisne varijable feritina u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi

		Zavisna varijabla		
		Feritin (ng/mL)		
P		R	B	p
	Er	0,860	33,108	0,795
	Hb	0,860	4,365	0,312
	HCT	0,860	-2,312	0,401
	TIBC	0,860	4,124	0,404
	% Sat	0,860	2,828	0,370
	Hepcidin	0,860	9,502	0,001**
	Fe	0,860	-8,523	0,172
	sTfR	0,860	61,096	0,379

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, ** p<0,001

Vrednost koncentracije hepcidina u kontrolnoj grupi bila je najznačajniji nezavisni prediktor vrednosti koncentracije feritina (Tabela 25).

Tabela 26. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi

Zavisna varijabla				
sTfR (mg/L)				
	R	B	p	
P	Er	0,654	-0,393	0,143
	Hb	0,654	-1,956E-02	0,025
	HCT	0,654	0,113	0,001**
	TIBC	0,654	-1,018E-03	0,879
	% Sat	0,654	-2,846E-03	0,648
	Hepcidin	0,654	-4,898E-03	0,01*
	Fe	0,654	-1,877E-02	0,242
	Feritin	0,654	2,419E-05	0,782

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *p<0,01, ** p<0,001

Vrednost koncentracije HCT i hepcidina kod bolesnika na hemodijalizi bili su najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije sTfR (Tabela 26).

Tabela 27. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika

Zavisna varijabla				
sTfR (mg/L)				
	R	B	p	
P	Er	0,825	-0,166	0,128
	Hb	0,825	-2,414E-03	0,799
	HCT	0,825	-3,390E-02	0,304
	TIBC	0,825	6,419E-03	0,160
	% Sat	0,825	-4,937E-03	0,377
	Hepcidin	0,825	2,252E-02	0,001**
	Fe	0,825	-3,532E-02	0,077
	Feritin	0,825	-1,018E-03	0,0001***

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, ** p<0,001, *** p<0,0001

Vrednost koncentracije hepcidina i feritina kod predijalizne grupe bili su najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije sTfR (Tabela 27).

Tabela 28. Multipla regresija zavisne varijable koncentracije sTfR u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi

		Zavisna varijabla		
		sTfR (mg/L)		
		R	B	p
P	Er	0,533	-6,515E-03	0,991
	Hb	0,533	-1,014E-02	0,597
	HCT	0,533	-6,174E-04	0,960
	TIBC	0,533	-1,280E-02	0,556
	% Sat	0,533	-1,455E-02	0,287
	Hepcidin	0,533	-1,071E-02	0,496
	Fe	0,533	3,645E-02	0,181
	Feritin	0,533	1,161E-03	0,379

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, NS za sve parametre

U kontrolnoj grupi nisu naeni nezavisni prediktori vrednosti koncentracije sTfR (Tabela 28).

Tabela 29. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u grupi bolesnika na hemodijalizi

		Zavisna varijabla		
		Fe (umol/L)		
		R	B	p
P	Er	0,884	0,521	0,819
	Hb	0,884	-2,738E-02	0,714
	HCT	0,884	4,914E-02	0,884
	TIBC	0,884	4,144E-02	0,459
	% Sat	0,884	0,294	0,0001***
	Feritin	0,884	-7,323E-04	0,316
	Hepcidin	0,884	3,234E-03	0,869
	Fe	0,884	-1,319	0,242

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *** p<0,0001

Procenat saturacije u grupi bolesnika na hemodijalizi bio je najznaajni nezavisni prediktor vrednosti koncentracije serumskog gvoža (Tabela 29).

Tabela 30. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u predijaliznoj grupi bolesnika

		Zavisna varijabla		
		Fe (umol/L)		
		R	B	p
P	Er	0,830	1,785	0,062
	Hb	0,830	-1,055E-02	0,900
	HCT	0,830	-0,555	0,051*
	TIBC	0,830	7,762E-02	0,051*
	% Sat	0,830	0,172	0,0001***
	Feritin	0,830	-1,426E-04	0,955
	Hepcidin	0,830	-4,218E-03	0,949
	Fe	0,830	-2,754	0,077

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, *p<0,05, *** p<0,0001

Vrednosti HCT, TIBC i procenata saturacije u predijaliznoj grupi bolesnika bili su najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije serumskog gvožđa (Tabela 30).

Tabela 31. Multipla regresija zavisne varijable serumske koncentracije Fe u odnosu na neke nezavisne prediktore u kontrolnoj grupi

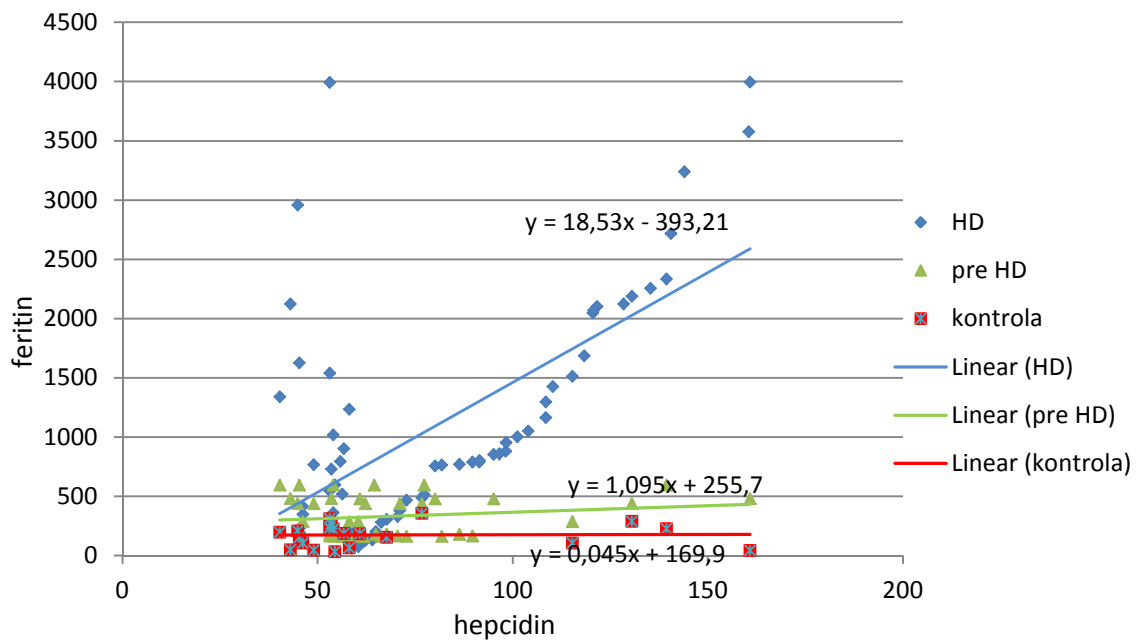
		Zavisna varijabla		
		Fe (umol/L)		
		R	B	p
P	Er	0,898	-6,302	0,282
	Hb	0,898	0,307	0,120
	HCT	0,898	-3,681E-02	0,780
	TIBC	0,898	0,600	0,002**
	% sat	0,898	0,400	0,001**
	Feritin	0,898	-1,903E-02	0,172
	Hepcidin	0,898	0,261	0,108
	Fe	0,898	4,284	0,181

P=nezavisna varijabla, R-multipni R za svaku varijablu posebno, ** p<0,001

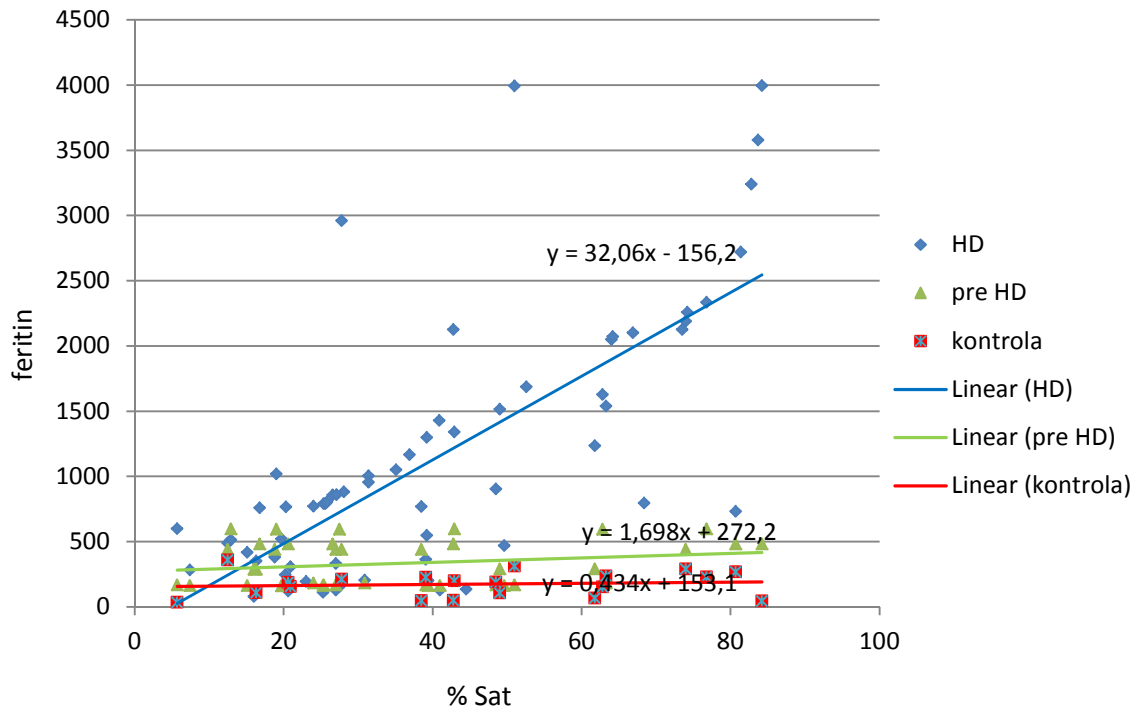
Vrednosti TIBC i procenata saturacije u kontrolnoj grupi bili su najznačajniji nezavisni prediktori vrednosti koncentracije serumskog gvožđa (Tabela 31).

5.8. Dijagrami rasipanja ispitanika

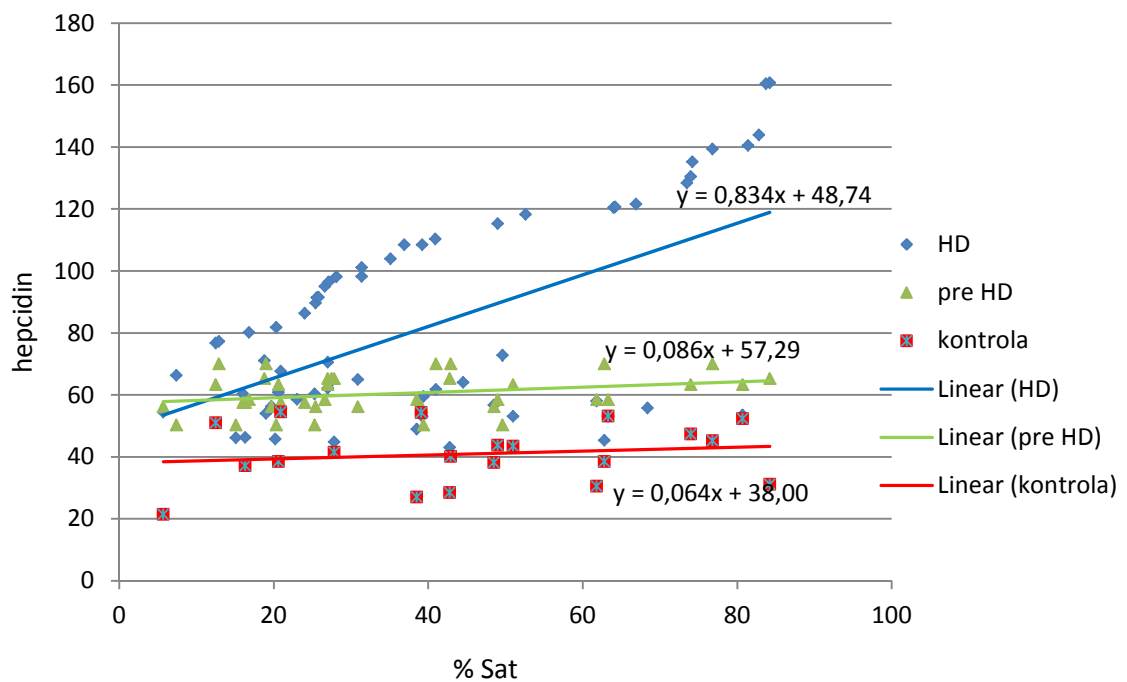
Zavisnost i me uzavisnost izme u promenljivih prikazana je linearnim dijagramima rasipanja (Grafikoni 5-9).



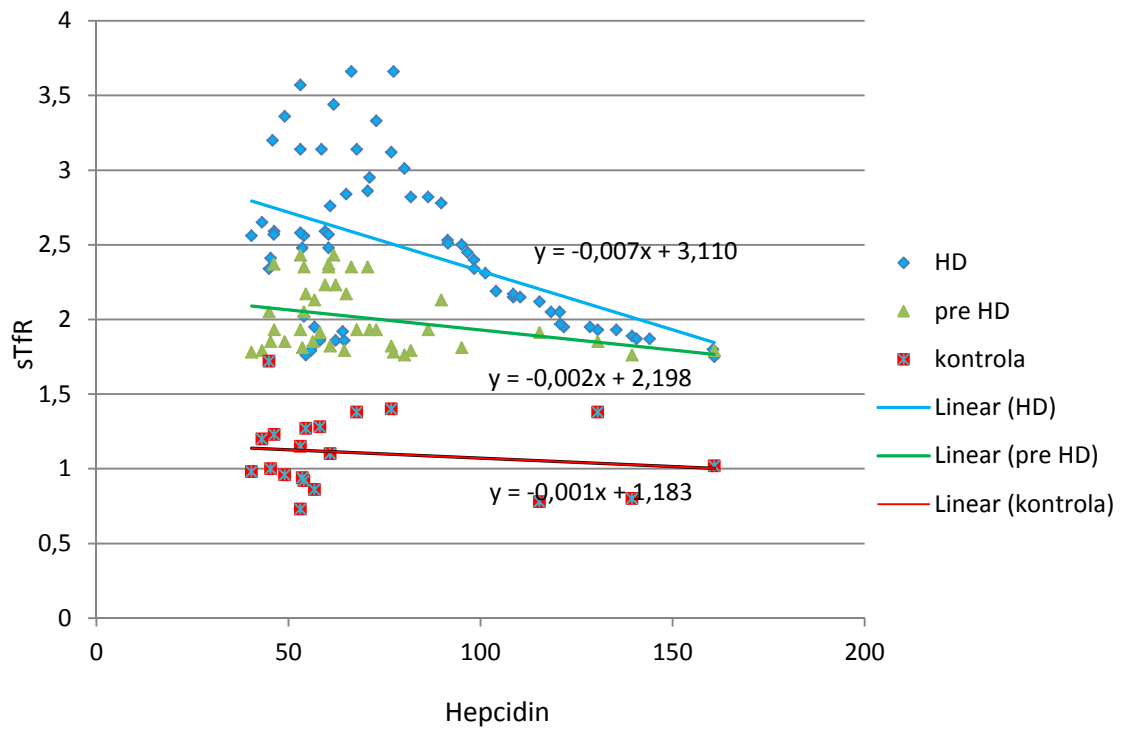
Grafikon 5. Povezanost vrednosti feritina sa vrednostima hepcidina



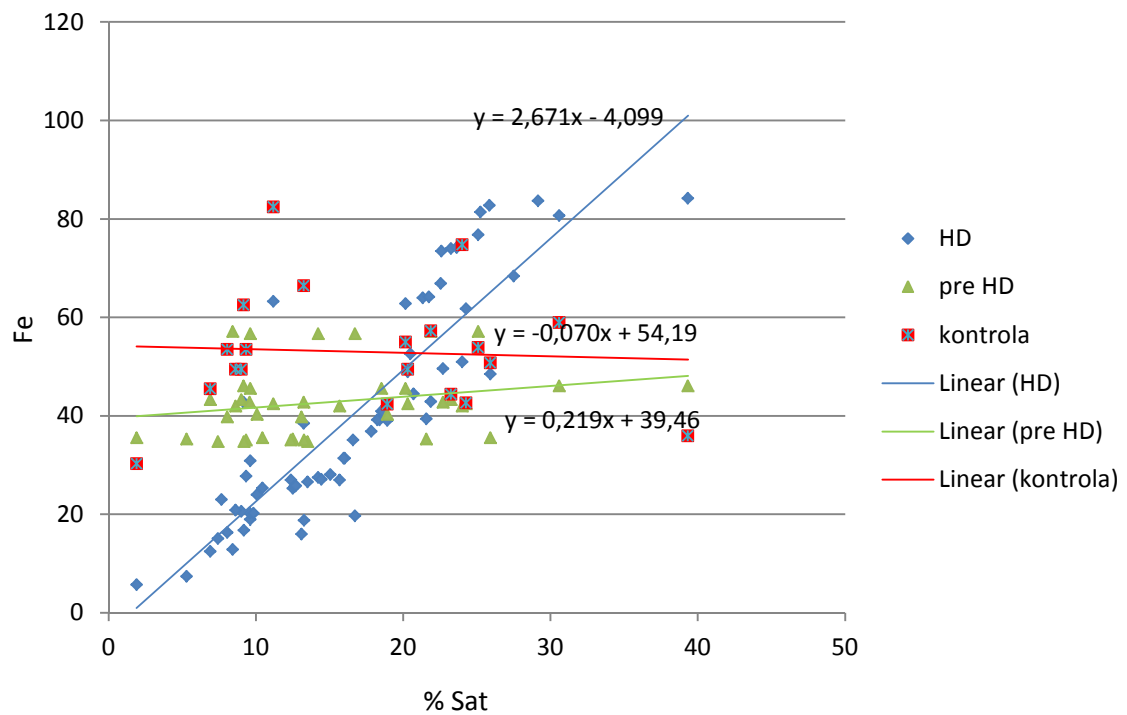
Grafikon 6. Povezanost vrednosti feritina sa vrednostima % saturacije



Grafikon 7. Povezanost vrednosti hepcidina sa vrednostima % saturacije



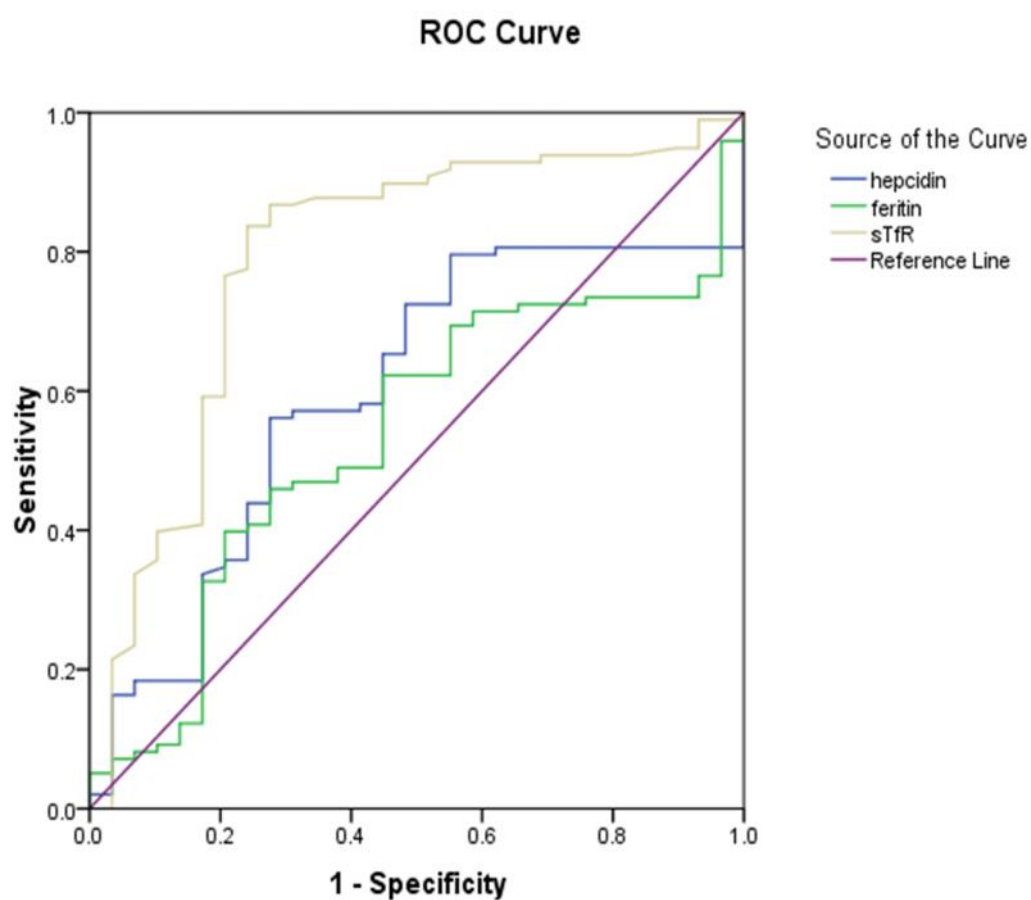
Grafikon 8. Povezanost vrednosti koncentracije sTfR i hepcidina



Grafikon 9. Povezanost vrednosti Fe sa vrednostima %saturacije

5.9. Senzitivnost i specifičnost prose nih vrednosti feritina, hepcidina i sTfR

ROC analiza je primenjena da bi se definisala senzitivnost i specifičnost za svaku prose nu vrednost feritina i hepcidina u klasifikaciji ispitanika na one sa saturacijom preko/ispod 30%.



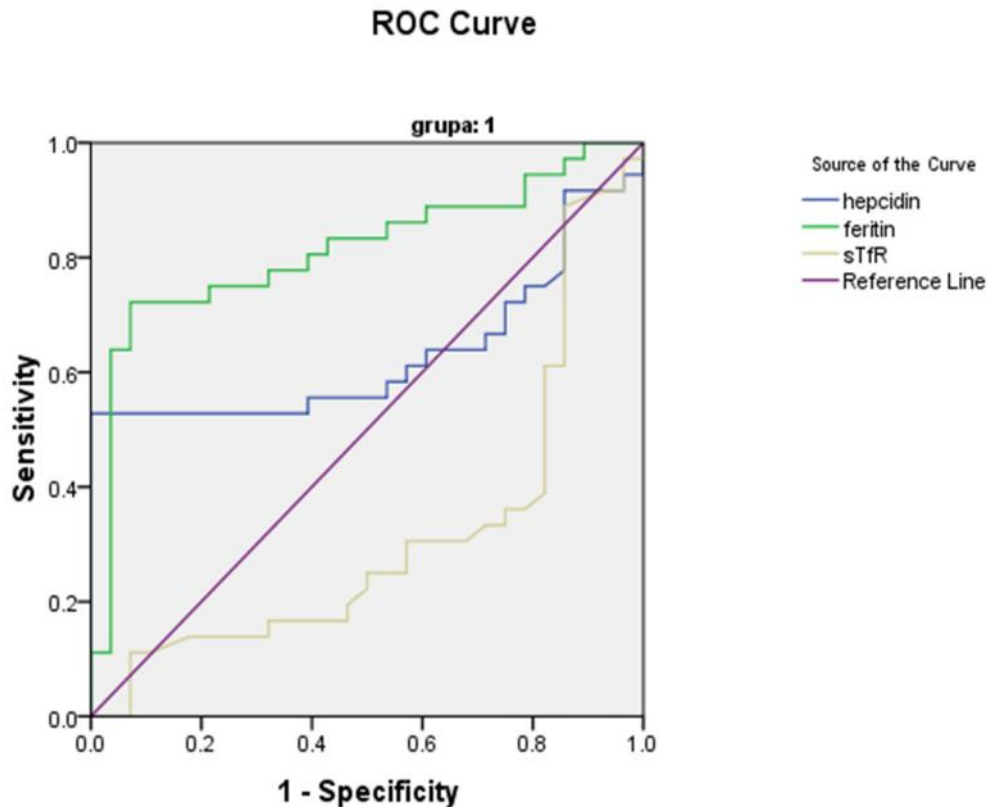
Grafikon 10. ROC kriva hepcidina, feritina i sTfR u ukupnoj populaciji

Tabela 32. Površina ispod ROC krive

	AUC	95%CI	p
Hepcidin	0,596	0,484-0,708	0,116
Feritin	0,534	0,421-0,647	0,577
sTfR	0,791	0,688-894	<0,001

AUC – površina ispod krive, 95%CI -95% interval poverenja

ROC analiza je pokazala da jedino sTfR ima prediktivnu vrednost za vrednost saturacije od 30% (AUC=0,791, $p<0,001$).



Grafikon 11. ROC kriva hepcidina, feritina i sTfR kod pacijenata na dijalizi

Tabela 33. Površina ispod ROC krive

	AUC	95%CI	p
Hepcidin	0,633	0,492-0,775	0,069
Feritin	0,813	0,704-0,923	<0,001
sTfR	0,318	0,180-456	0,013

AUC – površina ispod krive, 95%CI -95% interval poverenja

ROC analiza je pokazala da feritin i sTfR imaju prediktivnu vrednost za vrednost saturacije od 30% kod pacijenata na dijalizi .

Statistička obrada podataka

ROC analiza je korišćena da bi se procenila prediktivna vrednost ispitivanih markera.

6. DISKUSIJA

Porast uestalosti hroni nih masovnih nezaraznih oboljenja zapažen je u celom svetu pa i u našoj zemlji. Na ovo uti u intenzivne promene faktora životne sredine, uslova i na ina života, kao i produžen životni vek opšte populacije. Nedavno sprovedena velika istraživanja pokazuju da svaki deseti ovek na svetu ima hroni nu bubrežnu insuficijenciju. (Finkelstein i sar., 2012). Karakterišu je rastu a prevalenca i incidenca, veliki troškovi zamene bubrežne funkcije, zna ajno smanjenje kvaliteta života i prevremena smrt.

Terminalni stadijum hroni ne bubrežne insuficijencije predstavlja ošte enje bubrežne funkcije sa klirensom kreatinina ispod 15 ml/min. Dijaliza (hemodijaliza ili peritonealna) i transplantacija bubrega su oblici aktivne terapije koji zamenjuju trajno ošte enu bubrežnu funkciju i treba da obezbede normalno funkcionisanje svih organskih sistema, rehabilitaciju bolesnika i poboljšanje kvaliteta života.

Anemija koja je prate a manifestacija kod pacijenata sa HBI, a koja sa svoje strane zna ajno umanjuje kvalitet života ovih pacijenata zahteva permanentno pra enje i le enje. Naj eš i tip anemije je hipohromna mikrocitna anemija. Korekcija anemije dovodi do poboljšanja morfologije srca, smanjenja dužine hospitalizacije i poboljšanja kvaliteta života (Eschbach i sar., 1987; Powe i sar., 1994).

Rutinsko pra enje statusa gvož a kod pacijenata na hemodijalizi je od vitalne važnosti kako bi se spre ila pojava njegove deficijencije ili izbegle konstantno uve ane vrednosti. Odre ivanje stepena deficijencije gvož a kod pacijenata na HD je mnogo teže nego kod obi ne populacije. Identifikovane su tri vrste anemije u vezi sa homeostazom gvož a kod ovih pacijenata (apsolutni, funkcionalni deficit i retikuloendotelijalna blokada) (Suzuki i sar., 2012).

Zvani ni markeri koji se trenutno koriste za procenu statusa gvož a dijaliznih pacijenata nisu dovoljno specifi ni. Mali broj studija je dizajniran tako da omogu i pronalaženje pravog markera za pra enje statusa gvož a u okviru populacije bolesnika na dijalizi, kao i terapijski odgovor na njegovu nadoknadu, a dobijeni podaci esto su razli iti.

U cilju procene i značaja u regulaciji metabolizma gvožđa u ovom radu su pored standardnih biohemijskih markera koji služe za procenu statusa gvožđa kod pacijenata sa anemijom i hroničnim bubrežnim oboljenjem (HBO), ispitivani i neki novi koji još uvek nemaju široku primenu.

Biohemijski markeri koji se primenjuju u svakodnevnoj kliničkoj praksi su: koncentracija serumskog gvožđa, feritina, nezasićeni kapacitet za vezivanje gvožđa, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa i procenat saturacije transferina, a u nove markere spadaju koncentracija hepcidina i solubilnog transferinskog receptora.

Polna distribucija u ovoj studiji ukazuje na veću zastupljenost muškaraca među bolesnicima na dijalizi što je u skladu sa rezultatima u drugim studijama (Iseki i sar., 2005; Taal i sar., 2006).

U grupi ispitanika na HD zabeležena je značajno niža koncentracija proteina i albumina u odnosu na pre HD grupu. Izraženija hipoalbuminemija kod bolesnika koji su na hemodijalizi može se tumačiti kombinacijom nedovoljnog unošenjem hrane, dilucionim efektima i rezidualnom proteinurijom, (Dwyer i sar., 2002). Koncentracija albumina zavisi od njegove sinteze, katabolizma i distribucije izmeđ u vaskularnog i ekstravaskularnog prostora. Pravilni unos albumina je jedan od faktora koji utiče na njegovu koncentraciju, ali s obzirom da je albumin i reaktant akutne faze, u velikoj meri na njegovu koncentraciju utiče i inflamacija.

Bolesnici na hemodijalizi su u stanju hronične inflamacije, na šta ukazuju vrednosti CRP. Nivoi CRP-a pokazali su statistički značajno veće vrednosti u HD u odnosu na pre HD grupu, a urađena ANOVA analiza pokazala je da su vrednosti CRP-a najveće u HD grupi, značajno manje u pre HD grupi, i najmanje u kontrolnoj grupi.

Započinjanje lečenja hemodijalizom često dovodi do poremećaja metabolizma lipida i utiče na promenu već postojećeg poremećaja kod bolesnika sa terminalnim stadijumom HBI (Kaysen, 2009). Tip dijalize ("high-flux", "low-flux", biokompatibilnost), vrsta rastvora za hemodijalizu, upotreba heparina u toku hemodijalize, kvalitet vode za hemodijalizu, (mikroinflamacija, oksidativni stres) i koncentracija glukoze u rastvoru za hemodijalizu su neki od faktora koji mogu uticati na profil lipida kod bolesnika na hemodijalizi (Samouilidou i sar., 2012). Poremećaj metabolizma lipida kod bolesnika na hemodijalizi primarno nastaje zbog smanjenja

aktivnosti lipoproteinske lipaze, hepatske triglicerid lipaze i lecitinske holesterol acil transferaze (Liu i Rosner, 2006).

Uobičajeni lipidni profil kod bolesnika na HD podrazumeva povišene trigliceride zbog povećanja lipoproteina vrlo niske i intermedijalne gustine i smanjen HDL holesterol. Ukupni holesterol i LDL se obično kreću unutar normalnih vrednosti (Deighan i sar., 2000). Međutim, LDL frakcija je abnormalna i karakteriše je prisustvo LDL partikula niske gustine. Oksidativna modifikacija LDL-a jedan je od najvažnijih razloga aterosklerotskog oboljenja kod bolesnika na HD (Ramos i Martinez-Castelao, 2008).

Studije koje su ispitivale efekte rHuEPO na lipidni status bolesnika na HD pružile su različite rezultate. Neke od njih pokazale su da leenje eritropoetinom ne utiče na lipidni status (Prata i sar., 1998) ili da značajno smanjuje vrednosti ukupnog holesterola, LDL-a i triglicerida (Pollock i sar., 1994). U ovom ispitivanju vrednosti ukupnog holesterola i LDL-a bile su statistički značajno niže u HD grupi u odnosu na pre HD i kontrolnu grupu. Biohemijski mehanizmi koji uzrokuju ove promene lipidnog statusa uzrokovane eritropoetinom podrazumevaju porast aktivnosti lipoproteinske lipaze i hepatske triglicerid lipaze delovanjem ovog hormona (Goto i sar., 1999).

Koncentracija serumskih triglicerida bila je viša kod bolesnika na HD u odnosu na ostale grupe ispitanika, ali taj porast nije bio statistički značajan. Dobijeni rezultati su bili suprotni rezultatima nekoliko ispitivanja uključujući i CHOICE studiju (Pennell i sar., 2006; Longenecker i sar., 2002).

Rezultati ove studije pokazuju da bolesnici na hemodijalizi tretirani eritropoetinom i gvožđem imaju više vrednosti HDL u odnosu na predijaliznu grupu, što je u skladu sa rezultatima Siamopoulosa i saradnika (2006). I raniji rezultati su dokumentovali pozitivnu korelaciju između dužine primene eritropoetina i nivoa HDL, verovatno zbog njegovog antiinflamatornog delovanja (Aguilera i Selgas, 2004). Inzlamatorni medijatori inhibišu izlazak holesterola iz ćelija smanjenjem ekspresije adenozin trifosfat-vezujućeg gena (Baranova i sar., 2002). Ovo dovodi do smanjenja reverznog transporta holesterola i posledstvenog smanjenja nivoa HDL-a (Esteve i sar., 2005). Zbog toga, možemo pretpostaviti da povećanje HDL kod naših pacijenata na HD delom može biti posledica i antiinflamatornog delovanja eritropoetina.

6.1. Anemija kod pacijenata na hemodijalizi

Skoro jedna četvrtina bolesnika u ranim stadijumima HBI ima renalnu anemiju, a prevalenca raste do skoro 75% u kasnijim stadijumima (Roger i sar., 2004). Po nekim autorima ovaj broj raste i do 95% kod dijaliznih bolesnika (Valderrabano, 2003). Očekuje se da će broj obolelih i troškovi lečenja renalne anemije značajno porasti narednih godina sa povećanjem incidence bolesti kao što su dijabetes i hipertenzija, koji su glavni uzročnici HBI (Rossert i Froissart, 2006).

Bubrežna anemija utiče na sveukupno zdravlje bolesnika budući da narušava transport i iskoristljivost kiseonika u tkivima. Karakteriše se smanjenjem tolerancije na napor, radnog kapaciteta, koagulacije, kognitivnih i seksualnih funkcija, apetita tj. kvaliteta života.

U trećem stadijumu hroničnog bubrežnog oboljenja sa glomerularnom filtracijom od 30 do 59 ml/min/1,73 m² uestalost anemije je 5,2% do čak 44,1% u četvrtom, a skoro 100% u petom stadijumu, što je potvrđeno NHANES studijom (National Health and Nutrition Examination Survey) (Hsu i sar., 2002; Astor i sar., 2002).

Prisustvo renalne anemije u ovom ispitivanju određivano je na osnovu broja Eritrocita, nivoa Hb, HCT, MCV, MCH i MCHC. Osnovni hematološki parametri pokazali su statistički značajne razlike između u HD i pre HD grupe ispitanika. Broj Eritrocita, koncentracija Hb i HCT, MCV, MCH i MCHC pokazuju statistički signifikantno niže vrednosti u HD grupi u odnosu na pre HD grupu, a ANOVA analiza pokazala je da ovi parametri imaju najniže vrednosti u HD grupi, veće u pre HD grupi, a najveće u kontrolnoj grupi. Vrednosti eritrocitnih morfoloških parametara ukazuju na mikrocitnu hipohromnu anemiju. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Kazmija i sar. (2001).

Uzrok anemije kod pacijenata sa HBI može biti višestruk. Eritrociti imaju kratak život kod pacijenata sa HBI. Dok je normalni vek eritrocita oko 120 dana, ovaj period je smanjen na 60-90 dana. Najvažniji hemolitički faktori plazme su guanidin i njegovi derivati, kao i spermin koji se akumulira kod uremičnih bolesnika (Radtke i sar., 1980). Pored toga eritrociti uremičnih bolesnika su mnogo osetljiviji na oksidativni, osmotski i mehanički stres (Rosenmund i sar., 1975).

Pored hemolize eritrocita uzrok anemije je i gubitak krvi koji nastaje kao posledica same tehnike dijalize, uzorkovanje krvi u cilju dijagnostičkih procedura ili krvarenja iz digestivnog trakta (Fishbane i Maesaka, 1997). Iako hemoliza i hronični

gubitak krvi značajno doprinose razvoju anemije u HBI, oni obično nisu tolikog intenziteta da ne bi bili kompenzovani umerenim povećanjem sinteze eritrocita. Bolesnici sa HBI, međutim, nisu u stanju da povećaju eritropoezu kako bi kompenzovali nastalu anemiju. Najčešći uzrok je neadekvatno stvaranje endogenog EPO, koje prati nedostatak gvožđa. Kako napreduje bubrežna insuficijencija, deficijencija EPO je sve izraženija, bez obzira što se stvaranje EPO održava i u poslednjoj fazi renalnog oboljenja (pre HD grupa) zbog hipoksije koja dovodi do povećane sinteze EPO (Eckardt, 1994).

Smernice KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) za dijagnostiku i evaluaciju anemije u HBI iz 2012. predlažu kontrolu vrednosti hemoglobina najmanje jednom u tri meseca kod pacijenata sa HBI i kliničkim stadijumom 3-5, i najmanje jednom mesečno kod pacijenata sa kliničkim stadijumom 5. Ako je anemija prisutna (Hb manji od 13,0 g/dL kod muškaraca i 12,0 g/dL kod žena, bez obzira na starost i stadijum HBI) određuje se kompletna krvna slika, absolutni broj retikulocita, nivo serumskog feritina, vitamina B₁₂ i folne kiseline i %Sat. Posledice neelektne anemije mogu biti ozbiljne. Zato je redovno praćenje nivoa Hb neophodno. U poslednje dve decenije, primena stimulanse eritropoeze zauzima prioritarno mesto u lečenju anemije bolesnika u terminalnom stadijumu HBI (KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease, 2012).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da u ispitivanim grupama postoji statistički značajna pozitivna korelacija broja eritrocita sa vrednostima Hb i HCT, kao i vrednosti Hb sa HCT.

U retrospektivnom ispitivanju primene EPO kod bolesnika na HD primećeno je da njegovo produženo doziranje sa intervalima od jednom nedeljno do jednom u dve nedelje, pa čak i jednom u tri nedelje, sa najčešćim intervalom jednom u dve nedelje (Germain i sar., 2005) održava nivo Hb iznad 11 g/dL kod 82% pacijenata. Ispitivanje PROMPT (protein mapping and comparison tool) je nasumična prospektivna proba u kojoj su pacijenti dobijali epoetin alfa u intervalima od jedne, dve, tri ili četiri nedelje (Provenzano i sar., 2005). Nivoi Hb održavani su iznad 11 g/dL kod 90% pacijenata u intervalima od dve nedelje, a kod 75% pacijenata u grupi sa intervalima od 3 ili 4 nedelje. Jadoul i sar. (2004) su ispitivali pacijente na hemodijalizi sa jednom dozom u dve nedelje, a kada je interval produžen na četiri nedelje, 83% pacijenata je održalo nivo hemoglobina iznad očekivanih.

itav niz faktora rizika dovodi se u vezu sa prisustvom anemije kod pacijenata sa hroni nom bubrežnom insuficijencijom, poreme en hematološki profil, renalna disfunkcija, parametri inflamacije i smanjeni nivo albumina. Samo mali broj studija je ispitivao povezanost anemije i pothranjenosti pacijenata sa hroni nim bubrežnim oboljenjem. Slaba ishrana hospitalizovanih pacijenata sa hroni nom bubrežnom insuficijencijom preduslov je za nastanak razli itih zdravstvenih problema (Thorsdottir i sar., 2005). Ispitivanje Mitrache i sar. (2001) pokazalo je da smanjen nivo gvož a, folne kiseline i/ili vitamina B₁₂, mogu biti faktori u etiologiji anemije kod pacijenata sa HBI, koji su na terapiji oligoelementa i vitamina.

U ovom ispitivanju vrednosti vitamina B₁₂ i folne kiseline nisu se razlikovale u hemodijaliznoj i prehemodijaliznoj grupi, dok je kontrolna grupa imala ve e vrednosti folne kiseline u odnosu na grupe bolesnika sa HBI. Zachee i sar. (1992) su pokazali da se nedostatak vitamina B₁₂ retko dijagnostikuje kod bolesnika na HD zato što je vitamin B₁₂ vezan za proteine, pa ve ina izveštaja u literaturi pokazuje normalan ili visok nivo ovog vitamina u plazmi (Descombes i sar.,1993). Nedostatak vitamina B₁₂ može se javiti zbog gubitka u dijalizatu pri dijalizi sa membranom visokog protoka (Zachee i sar., 1992).

Zna ajna razlika folne kiseline izme u grupa bolesnika sa HBI i kontrolne grupe, govori u prilog injenici da inflamacija i uremijska intoksikacija imaju zna ajnu patogenetsku ulogu ne samo u metabolizmu gvož a, ve i u metabolizmu mnogih drugih biomolekula koji u estvuju u homeostazi gvož a kod pacijenata na hemodijalizi (Westhuyzen, 1998).

Iako naši podaci pokazuju da vrednosti vitamina B₁₂ i folne kiseline ne igraju bitnu ulogu u etiologiji anemije kod ispitivanih grupa, ovi nutritivni faktori mogu biti važni u le enju anemije kod pacijenata na terapiji EPO. Bez obzira što su serumske koncentracije folne kiseline u normalnim granicama, suplementi folne kiseline poboljšavaju efekte EPO terapije (Thorsdottir i sar., 2005). Imaju i u vidu zna aj folne kiseline u sintezi nukleinskih kiselina, razumljivo je da terapija folatima može biti direktno odgovorna za poboljšanu eritropoezu, tj deobu elija.

6.2. Metabolizam gvož a kod pacijenata na hemodijalizi

Status gvož a kod bolesnika na dijalizi i u predijaliznom periodu ispitivan je analizom koncentracije serumskog gvož a i feritina, nezasi enim kapacitetom za

vezivanje gvoža, ukupnim kapacitetom za vezivanje gvoža i procentom saturacije transferina.

Unutrašnja razmena gvoža izmeđ u koštane srži, eritrocita i retikuloendotelijalnog sistema kod pacijenata na hemodijalizi iznosi dnevno oko 20 mg (Kooisra i sar., 1995). U odsustvu rHuEPO-a, kod pacijenata sa uznapredovalim renalnim oboljenjem javlja se smanjena razmena gvoža iz koštane srži do eritrocita, a povećano je skladištenje u RES-u. Kada se stvaranje eritrocita stimuliše upotrebom rHuEPO unutrašnja razmena gvoža kod pacijenata na dijalizi je slična kao kod zdravih osoba, iako retikuloendotelijalni sistem i dalje zadržava više gvoža nego kod pacijenata sa normalnom renalnom funkcijom.

U ovom ispitivanju je pokazano da su pacijenti na hemodijalizi imali najmanju koncentraciju serumskog gvoža, statistički značajno nižu u odnosu na predijalizne pacijente, a ANOVA analiza je pokazala da je koncentracija gvoža najmanja u hemodijaliznoj, veća u prehemodijaliznoj, a najveća u kontrolnoj grupi. Moguće objašnjenje dobijenih rezultata moglo bi da bude poremećena apsorpcija gvoža, spoljašnji gubici krvi i funkcionalna deficijencija gvoža (Fishbane i Maesaka, 1997).

Apsorpcija gvoža iz gastrointestinalnog trakta regulisana je nivoom gvoža u skladištima, eritropoetinom i eritropoezom (Spivak, 1997). Crveno meso sadrži hem gvože koje se brže apsorbuje (Charlton i Bothwell, 1983), i ograničenu unosu ove namirnice kod pacijenata na dijalizi može biti odgovorno za smanjenu količinu apsorbovanog gvoža. Procenat apsorbovanog gvoža unetog hranom kod osoba sa normalnom renalnom funkcijom je takođe mali, oko 1 mg gvoža dnevno. Sa druge strane, apsorpcija gvoža se povećava kod ubrzane eritropoeze ili smanjenja gvoža u skladištima (Spivak, 1997).

Postoji nekoliko faktora koji doprinose stalnom gubitku krvi kod pacijenata na dijalizi, uključujući i krv koja se zadržava u dijalizatoru i cevima pri kraju svake dijalize, lesta testiranja, skrivena krvarenja u gastrointestinalnom traktu, kao i gubitke krvi nakon uvođenja ili skidanja igle za dijalizu (Fishbane i Maesaka, 1997). Dokazano je da se na ovaj način godišnje gubi oko 1-3g gvoža (Akmal i sar., 1994). Radna grupa za anemiju je ustanovila da je potrebno oko 25 do 100mg gvoža nedeljno kako bi se nadoknadili gubici kod pacijenata na dijalizi (NKF-DOQI clinical practice guidelines, 1997).

U identifikovanju i lečenju deficijencije gvoža kod pacijenata na dijalizi je uveden koncept funkcionalne deficijencije gvoža (Eschbach i sar., 1987; Eschbach.,

1991). Funkcionalni nedostatak gvožd a je prisutan kada se na uobičajenim testovima za deficijenciju gvožd a ne pokazuje apsolutna deficijencija, ali se kod pacijenata javlja dobra reakcija na terapiju gvožd em sa porastom hematokrita na ujednaenoj dozi EPO-a, ili sa stabilnim hematokritom na niskoj dozi EPO-a. Pacijenti sa funkcionalnom deficijencijom gvožd a, imaju nedovoljnu količinu gvožd a koja je potrebna za zahteve stimulisane eritropoeze koji se javljaju nakon davanja egzogenog EPO-a (Cavill i Macdougall, 1992).

Neadekvatna dostupnost gvožd a, zbog apsolutne ili funkcionalne deficijencije gvožd a, je najčešći uzrok slabog odgovora na rHuEPO (Kleiner i sar., 1995; Sunder-Plassman i Horl, 1997). Anemija usled deficijencije gvožd a nastaje usled odsustva dovoljnih količina gvožd a u skladištima za održavanje procesa eritropoeze. Gvožd e je prisutno u cirkulaciji u eritrocitima i mioglobinu, u koštanoj srži, u depozitima u splenicima RES-a i makrofagima. Primena rHuEPO, može potencirati postojeći i nedostatak gvožd a, naročito kod pacijenata na hemodijalizi, kod kojih se javljaju veliki gubici krvi (Lindsay i sar., 1973). Zato je paraneuralna primena gvožd a neophodna, samostalno ili u kombinaciji sa rHuEPO-om (Garneata, 2008).

Kod nekih pacijenata, nemogućnost mobilizacije gvožd a se često povezuje sa retikuloendotelijalnom blokadom (Means i Krantz, 1992). Pacijenti na dijalizi mogu imati i prateće skrivene infekcije ili neka druga stanja koja utiču na adekvatan odgovor na terapiju gvožd em ili sprečavaju upotrebu gvožd a iz skladišta koja bi u normalnim uslovima bila dovoljna za održavanje eritropoeze. Ovaj efekat može nastati usled povišenih nivoa cirkulirajućih citokina koji su sposobni za indukciju makrofaga iz retikuloendotelijalnog sistema koji prihvataju i zadržavaju gvožd e. Povećanje koncentracije citokina može delovati na smanjenje proizvodnje endogenog EPO-a, ili na smanjenje odgovora splin eritroidnih prekursora na endogeni ili egzogeni EPO. Interleukin-1 (verovatno preko interferona- γ) i faktor nekroze tumora pokazuju ovakve efekte (Schooley i sar., 1987; Johnson i sar., 1990; Clifton i sar., 1990; Faquin i sar., 1993). Interleukin-6 takođe smanjuje odgovor splin na EPO (Macdougall i sar., 1994). Takvi pacijenti imaju nizak nivo saturacije transferina i povišene nivoe feritina u serumu. Terapija gvožd em, za razliku od pacijenata sa funkcionalnim nedostatkom gvožd a, ne daje željene rezultate.

Ovo ispitivanje je pokazalo da bolesnici na hemodijalizi imaju statistički značajno niže vrednosti UIBC ($p < 0,01$) u odnosu na predijalizne bolesnike, a komparativna analiza (ANOVA) je pokazala da su vrednosti UIBC statistički značajno niže u HD grupi u

odnosu na ostale grupe. Vrednosti TIBC su statisti ki signifikantno najviše u kontrolnoj grupi u odnosu na grupe bolesnika sa HBI. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja Kalantar-Zadeh i sar. (1998). Oni su tako e pokazali postojanje jake korelacije TIBC i gvož a kod pacijenata na HD, dok je studija Rachele i sar. (2009), pored pozitivne korelacije TIBC i gvož a pokazala i da je TIBC negativno korelirao sa vrednostima serumskog feritina kod pacijenata na HD. U našem istraživanju vrednosti TIBC pozitivno su korelirale sa gvož em, brojem Er i Hb jedino kod bolesnika na hemodijalizi. Budu i da TIBC i UIBC stoje u relativnom odnosu, niži TIBC ima i niži UIBC, tako da ovaj relativni odnos nikako ne ide u prilog da su pacijenti na HD u prednosti jer imaju niži nezasi eni kapacitet.

Smernica radne grupe za anemiju (NKF-K/DOQI) 1997., 2001. i 2006. dale su preporuke da nivo feritina i saturacija serumskog transferina treba da budu primarno sredstvo u proceni stanja gvož a kod pacijenata sa anemijom i hroni nim bubrežnim oboljenjem (HBO), uklju uju i i terminalnu fazu (NKF-K/DOQI clinical practice guidelines, 2006). Serumski feritin je pokazatelj rezervi gvož a, a apsolutna deficijencija gvož a, prema NKF-K/DOQI smernicama, je u korelaciji sa serumskim feritinom <100 ng/ml. Apsolutna deficijencija gvoz a, koju karakterišu nisko ili potpuno odsustvo bojenja koštane srži na gvož e, razlikuje se od funkcionalne ili relativne deficijencije, koja se definiše kao odgovor na intravensko gvož e sa pove anjem hemoglobina (Hb) ili smanjenjem potreba agensa za stimulaciju eritropoeze (rHuEPO). Ovo se može javiti kod pacijenata sa nivoima serumskog feritina koji su znatno viši od 100 ng/ml (Fishbane i Maesaka, 1997; NKF-K/DOQI clinical practice guidelines, 2001).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je koncentracija feritina statisti ki zna ajno najve a u HD grupi, niža u pre HD, a najniža u kontrolnoj grupi. Vrednosti koncentracije feritina mogu se objasniti inflamacijom, na šta ukazuju i vrednosti CRP koje su u HD grupi statisti ki zna ajno ve e u odnosu na pre HD i kontrolnu grupu . Vrednosti % Sat su nešto niže kod hemodijaliznih u odnosu na prehemodijalizne pacijente, ali statisti ki nisu zna ajne. Ispitivani pacijenti su primali terapiju eritropoetina i gvož a po protokolu da bi se nivo saturacije transferina održavao u normalnim vrednostima, pa su dobijeni rezultati pokazatelj adekvatnog terapijskog odgovora na šta ukazuje i statisti ki zna ajna pozitivna povezanost serumske koncentracije Fe sa procentom saturacije i feritinom koja je bila prisutna u obe grupe ispitanika, kao i procenta saturacije sa vrednostima feritina.

Multipna regresiona analiza je pokazala da je procenat saturacije navažniji nezavisni prediktor nivoa feritina i serumskog gvoža u grupi bolesnika na hemodijalizi.

Velika studija je proučavala uzroke komplikovanog održavanja ravnoteže gvoža kod pacijenata na dijalizi je ESRD National Cooperative Anemia Project kojim predsedava Health Care Financing Administration (administracija za finansiranje zdravstvene nege), koji je ispitivao uzroke hematokrita nižeg od 25% u grupi pacijenata na hemodijalizi koji primaju rHuEPO. Kod 60% pacijenata pronađena je deficijencija gvoža (definisana kao saturacija transferina (%Sat) manja od 20% i/ili nivo feritina manji od 100 ng/ml). Američka firma Data System potvrđuje ove nalaze (United States Renal Data System, 1996).

Druga studija koja se bavila ovim problemom kod pacijenata na hemodijalizi (Dialysis morbidity and mortality study) pronašla je %Sat manji od 20% kod 54% pacijenata, a %Sat manji od 10% kod 25% pacijenata. Nivo feritina niže od 100 ng/ml imalo je 36% pacijenata. Skoro jedna trećina pacijenata nije primala gvože u ovom periodu (Maiorca i sar., 1993).

Klinički značaj ova dva istraživanja potvrđuju rezultati Health Care Financing Administration Core Indicators Project (1996 ESRD Core Indicators Project, 1997). Ovo ispitivanje je pratilo nivo hematokrita kod 7292 pacijenta na hemodijalizi. Do kraja 1993 godine samo je kod 46% pacijenata postignut hematokrit veći od 30%. Do kraja 1995 godine ovaj broj se povećao na 63%, zatim na 72% do kraja 1996. Količina rHuEPO-a potrebna za dobijanje ovih vrednosti hematokrita bila je veća kod onih pacijenata sa niskim %Sat.

Povećana učestalost višestrukih komorbiditeta među anemičnim pacijentima sa hroničnim bubrežnim oboljenjem dovela je do toga da je upotreba saturacije serumskog transferina i koncentracije feritina kao biomarkera kompleksnija u postavljanju dijagnoze deficijencije gvoža. Serumski feritin, kao reaktant akutne faze na prisutno inflamatorno stanje mogu sprečiti mobilizaciju gvoža iz retikuloendotelijalnih rezervi. Pacijenti sa serumskim feritinom >800 ng/ml, koji ukazuje na povišeno gvože, i saturacijom transferina <20%, što ukazuje na deficijenciju gvoža, su sve češći. Zbog činjenice da je reaktant akutne faze i da postoje razlike nivoa između polova (obično niži kod žena) feritin nije idealan marker za određivanje deficijencije gvoža. I %Sat poseduje određenu reaktivnost u akutnoj fazi utoliko što transferin može biti povišen u inflamatornom stanju, što bi dalje snizilo %Sat ako je cirkulišuće gvože konstantno.

Transferin može biti nizak zbog smanjene sinteze transferina kod neuhranjenosti ili hroni nog oboljenja, što može povećati %Sat, ako je cirkulišuće gvožđe konstantno. Postoje i značajne dnevne fluktuacije u nivou %Sat koje otežavaju interpretaciju njegovih vrednosti, ako doba dana uzimanja uzoraka varira od testa do testa (NKF-K/DOQI clinical practice guidelines, 2001; Kalantar-Zadeh i sar., 2004).

Iz ovih razloga u dijagnozu deficijencije gvožđa uvode se novi testovi koji podrazumevaju sadržaj hemoglobina u retikulocitima, procenat hipohromnih eritrocita, koncentracija hepcidina i solubilnog transferinskog receptora, koji daju povoljne rezultate u ograničenim ispitivanjima (Wish, 2006).

6.3. Hepcidin i značaj određivanja kod bolesnika na hemodijalizi

Ovim ispitivanjem pokazano je da je koncentracija hepcidina u serumu kod ispitanika na hemodijalizi statistički značajno veća u odnosu na koncentraciju kod prehemodijalizne grupe. ANOVA analizom potvrđeno je da je koncentracija hepcidina statistički najveća u HD, niža u pre HD, a najniža u kontrolnoj grupi.

Dobijeni rezultati su u skladu sa ispitivanjem De Dominika i sar. (2007) koji je potvrdio postojanje inhibitorynog dejstva hepcidina na nivo gvožđa. Ovakav odnos se objašnjava mehanizmom negativne povratne sprege, jer gubitak ferroportina-1 sa površine elije uzrokuje redukciju gvožđa u plazmi, što ima za rezultat nisku saturaciju transferina. Na taj način se manje gvožđe transportuje do eritroblasta, što dovodi do hronične anemije koja pojačava stvaranje hepcidina. Sa druge strane, smanjenje aktivnosti ferroportina-1 dovodi do zadržavanja gvožđa na nivou intestinalnih enterocita, hepatocita i makrofaga, što ukazuje na važnost praćenja hepcidina tokom korekcije anemijskog sindroma kod pacijenata na dijalizi, jer se povećanje saturacije transferina i bolja ispunjenost eritrocita ne odražavaju na povećanje njihovog broja, za razliku od pacijenata u prehemodijaliznom periodu (De Domenico i sar., 2007). Bolesnici na hemodijalizi su u stanju hronične inflamacije koju može uzrokovati sama dijaliza, što dovodi do povećanja koncentracije cirkulišućih citokina kao što su interleukin-1 (IL-1) i interleukin-6 (IL-6), faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α) ili γ -interferon (Stenvinkel, 2001; Ludwiczek i sar., 2003; Weiss i Goodnough, 2005; Zaritsky i sar., 2009; Jairam i sar., 2010). U toku upalnih stanja dolazi do povećane sinteze hepcidina mehanizmom koji je nezavisan od statusa gvožđa i aktivnosti eritropoetina (Hugman, 2006). Kaskada poremećaja koja dovodi do anemije upale kreće se od IL-6 do sinteze hepcidina, pa do hipoferemije i na kraju

rezultira anemijom upale (Ganz i sar., 2006). Anemija upale nastaje kao posledica hipoferemi nog odgovora na upalu (Dallalio i sar., 2006).

U ovom ispitivanju postojala je pozitivna korelacija izme u koncentracije hepcidina i CRP-a kod dijaliznih pacijenata. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja Rivera i sar. (2005),gde su koncentracije hepcidina bile u visokoj korelaciji sa anemijom inflamacije. Me utim kod pacijenata sa mešovitom anemijom prime eno je slabije pove anje hepcidina (inflamacija i deficijencija gvož a) uprkos injenici što se kod ovih pacijenata detektovao viši nivo CRP. Ovo neslaganje može se objasniti razlikom u polu-životu CRP i hepcidina (za CRP 19 sati, za hepcidin može biti i kra i).

Analiza koncetracije hepcidina i vrednosti CRP može služiti kao brz i lak na in identifikacije razlike izme u deficijencije gvož a, inflamacije i mešovite anemije (Jairam i sar., 2010). U takvoj dijagnosti koj organizaciji, nizak nivo CRP i nizak hepcidin bi ukazivali na deficijenciju gvož a, visok CRP i hepcidin na inflamaciju, a visok CRP i nizak hepcidin na kombinaciju inflamacije i deficijencije gvož a. Cilj takve analize bio bi utvr ivanje korisnosti primene terapije gvož em i eritropoetinom, odnosno identifikacija pacijenata koji ograni eno reaguju na ovu terapiju. Ovakvi testovi mogu definisati uslove u kojima bi se sprovodila alternativna terapija anemije, kao što je upotreba antagonista hepcidina.

Ovo ispitivanje pokazalo je da je koncentracija hepcidina statisti ki zna ajno najve a u grupi feritina <100 ng/mL i >500 ng/mL u odnosu na ostale feritinske grupe bolesnika. Zna ajno ve a koncentracija hepcidina u grupi sa feritinom >500 ng/ml može se objasniti postojem inflamacijom, obzirom da ova grupa bolesnika ima i statisti ki najve e vrednosti CRP u odnosu na ostale feritinske grupe.

Jedno od objašnjenja ve ih vrednosti hepcidina u feritinskoj grupi <100 ng/ml je i hipoalbuminemija. ANOVA analizom na ena je statisti ki zna ajna razlika u koncentraciji albumina izme u ispitivanih grupa bolesnika, pri emu su najniže vrednosti proteina i albumina u HD grupi, ve e u pre HD grupi, a najve e u kontrolnoj grupi ispitanika. Objašnjenje dobijenih rezultata treba tražiti u injenici da su bubrezi ne samo važni u sintezi,ve i u eliminaciji hepcidina. Smatra se da su albumini (Małyszko i sar., 2005) i -2-makroglobulin (Peslova i sar., 2009) specifi ni proteini za vezivanje hepcidina, pa hipoalbuminemija kod bolesnika na hemodijalizi može da dovede do visokih vrednosti hepcidina. Ovo potvr uje negativna i statisti ki zna ajna korelacija koju smo našli izme u hepcidina i albumina kod bolesnika sa HBI, dok je ta povezanost bila

slabo pozitivna i statistički nesignifikantna u kontrolnoj grupi.

Povećan nivo CRP-a je snažan i nezavisan prediktor niskog nivoa albumina, što ukazuje da hipoalbuminemija kod bolesnika na HD primarno može da bude posledica inflamacije, a ne samo malnutricije (Yeun i sar., 2000).

U ovom ispitivanju dokazano je postojanje statistički značajne pozitivne povezanosti između koncentracije hepcidina i feritina u svim ispitivanim grupama. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja Petersa i sar. (2010) koji su ispitivali samo grupu bolesnika na hemodijalizi. U studiji Ashby i sar. (2009) ta povezanost je prisutna u predijaliznoj i kontrolnoj grupi, ali nije postojala kod hemodijaliznih bolesnika. Inflamatorni citokini pored toga što utiču na sintezu hepcidina, stimulišu i sintezu feritina i smanjuju apsorpciju gvožđea, te na taj način povećavaju skladištenje gvožđea, a smanjuju njegovu dostupnost eritrocitima (Hentze i sar., 2010). Interakcija proinflamatornih citokina sa hepcidinom u ovom ispitivanju može objasniti zašto ovi bolesnici imaju visoke nivoe feritina, slabu apsorpciju gvožđea i smanjeno otpuštanje gvožđea iz makrofaga.

Statistički značajna pozitivna povezanost postojala je između koncentracije hepcidina i gvožđea i koncentracije hepcidina i procenta saturacije u hemodijaliznoj i prehemodijaliznoj grupi, dok ista nije prisutna u kontrolnoj grupi. Ova povezanost nije bila prisutna u ispitivanju Taes i sar. (2004), koji su pokazali da koncentracija hepcidina nije povezana sa serumskim kreatininom, hemoglobinom, gvožđem i feritinom. Koncentracije hepcidina je pozitivno korelirala sa ⁵¹Cr-EDTA (chromium-51 labeled ethylenediamine tetraacetic acid) klirensom, klirensom kreatinina, kreatininom u serumu, -trace proteinom i cistatinom C. Kulaksiz i sar. (2004) su dokazali da je kod pacijenata na HD povećana koncentracija hepcidina. U njihovom ispitivanju nije zapažena korelacija između hepcidina, statusa gvožđea, feritina i saturacije transferina.

Ovo ispitivanje pokazalo je i da je u svim ispitivanim grupama feritin najznačajniji nezavisni prediktor koncentracije hepcidina, ali i da je najznačajniji nezavisni prediktor promene koncentracije feritina hepcidin. U hemodijaliznoj grupi najznačajniji nezavisni prediktor koncentracije hepcidina je vrednost koncentracije sTfR.

Sinteza hepcidina u hepatocitima je regulisana mnogobrojnim, delom i suprotnim signalima koji uključuju: koncentraciju gvožđea u organizmu (prevažodno količinu Tf-Fe₂), količinu gvožđea u deponijama u jetri, intenzitet eritropoeze, hipoksiju i stanje inflamacije. Svi ovi signali se sumiraju na nivou transkripcije DNK i od zbiru njihovih

efekata zavisi da li će doći do stimulacije ili inhibicije sinteze hepcidina (Bleackley i sar., 2009; Franchini i sar., 2010).

Povećano stvaranje hepcidina igra bitnu ulogu u patofiziologiji anemije usled inflamacije i hroničnog oboljenja, pa bi razvoj antagonista hepcidina bio veoma koristan za lečenje ovog oboljenja, jer bi se olakšala redistribucija gvožđa iz makrofaga do eritroblasta. Blokiranjem hepcidina gvožđe iz rezervi se mobilizuje, a antagonisti hepcidina se mogu koristiti kao dodatak ili umesto terapije suplementima gvožđa. Antagonisti hepcidina mogu biti korisni u lečenju anemije inflamacije kada je primarna bolest rezistentna na terapiju. Kod anemičnih pacijenata sa hroničnim bubrežnim oboljenjem sa poremećajem sinteze eritropoetina, antagonist hepcidina može poslužiti kao suplement terapiji rHuEPO, naročito kod pacijenata sa slabim odgovorom na terapiju (Malyszko i Mysliwiec, 2007).

Kato i sar. (2008) su procenili, da hepcidin može da bude prediktor eritropoetskog odgovora kod pacijenata na hemodijalizi. Semikvantitativno merenje prohepcidina i hepcidina u ovoj studiji nije dalo odgovarajuće rezultate. Merenje jedne vrednosti hepcidina u serumu pre početka lečenja anemije ne može da bude dovoljno da predvidi odgovor na terapiju i.v. gvožđem i/ili eritropoetinom sa velikom tačnošću. Obzirom da se nivo hepcidina brzo reguliše, početne promene u serumu na početku terapije i.v. gvožđem ili eritropoetinom mogu da budu bolji parametar za procenu dugoročnog odgovora na terapiju.

U budućnosti će možda hepcidin postati cilj terapije, jer smanjenje nivoa hepcidina može poboljšati gastrointestinalnu apsorpciju gvožđa i njegovo oslobađanje iz makrofaga, što će ograničiti potrebu za i.v. gvožđem, prevazići funkcionalni nedostatak gvožđa i smanjiti rezistenciju na rHuEPO (Swinkels i Wetzels, 2008).

6.4. Transferinski receptori i značaj određivanja kod bolesnika na hemodijalizi

Transport gvožđa u plazmi sprovodi se preko transferina koji doprema gvožđe do ćelija putem interakcije sa specifičnim receptorima na membrani. Sve ćelije, osim zrelih eritrocita, poseduju TfR na svojoj površini, a najveći broj nalazi se na matičnim ćelijama eritrocita, placenti i jetri. Kod odraslih osoba se oko 80% sTfR nalazi u koštanoj srži.

Rasprostranjenost receptora na eritrocitima proliferacije povezana je sa postojećim količinama gvožđa, jer smanjenje gvožđa dovodi do ubrzanе sinteze sTfR, dok povećane količine gvožđa smanjuju njihov broj. Zato ukupan broj eritrocitnog sTfR zavisi i od broja eritroidnih prekursora u kostnoj srži i od broja sTfR po eritrocitu, kao i stanja gvožđa unutar eritrocita.

Transferin sprečava pojavu slobodnog gvožđa u plazmi, koje može biti toksično po eritrocite. Ova zaštita zavisi od dve osobine transferina: visokog afiniteta (K_d 10–20 M) prema Fe^{3+} i od činjenice da svaki molekul transferina ima dve lokacije za vezivanje gvožđa (Szke i Panteghini, 2012).

Transferin i saturacija transferina se dugi niz godina koriste kao markeri za detekciju nedostatka sistemskog gvožđa i zasićenja. Opšti nedostatak tradicionalnih biomarkera u poređenju sa novijim dijagnostičkim testovima jeste upotreba koja nije zasnovana na dokazima. Klinička praksa preporučuje upotrebu transferina samo u specifičnim situacijama, pre svega kod terapije pacijenata sa hroničnim bubrežnim oboljenjem, a ne kao test izbora u dijagnozi i lečenju deficijencije uopšte. Kvalitet dokaza i stabilnost kliničkih preporuka su uglavnom slabi i često zasnovani samo na mišljenjima stručnjaka (Szke i Panteghini, 2012).

U ovom istraživanju pokazano je da je koncentracija sTfR bila statistički značajno viša u HD u odnosu na pre HD grupu, a komparativnom analizom (ANOVA) pokazana je statistički značajno najviša koncentracija sTfR u HD grupi, niža u pre HD, a najniža u kontrolnoj grupi.

Cirkulišući sTfR izvedeni primarno iz eritroidnih prekursora eritrocita svojim nivoom obezbeđuju pouzdano merenje totalne eritropoeze. Sa kliničke tačke gledišta bazalni nivo sTfR dokazano je upotrebljiv za predviđanje hemoglobinskog odgovora nakon inicijalne terapije eritropoetinom kod pacijenata na dijalizi. Ahluwalia i sar. predložili su broj retikulocita i nivo sTfR kao metode za predviđanje hemoglobinskog odgovora nakon povećanja doze eritropoetina (Ahluwalia i sar., 1997).

U stanjima deficita gvožđa pokazano je da je ekspresija sTfR od strane retikuloendotelijalnog sistema direktno srazmerna eritrocitnim potrebama za gvožđem. U ovom ispitivanju je prisutna statistički značajna negativna povezanost koncentracija sTfR sa vrednostima koncentracije serumskog Fe (Centis i sar., 1995).

Značajna negativna povezanost koncentracije sTfR i feritina pokazana je u obe grupe sa HBI, a u HD grupi i sa hepcidinom i procentom saturacije transferina. U grupi

predijaliznih pacijenata Pearsonov korelacioni test pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju sTfR sa brojem Er (Tabela 14). Statistički značajna negativna povezanost koncentracije sTfR i feritina u ovom istraživanju, dokazana je i u studiji Mahdavi i sar. (2011) kod pacijenata na HD gde je nivo serumskog feritina bio znatno viši nego kod kontrolne grupe.

Negativna povezanost je pronađena i u feritinskim grupama kod pacijenata na hemodijalizi (komparativnom analizom ANOVA), koja je pokazala statistički značajno nižu koncentraciju sTfR u grupi feritina >500 ng/mL u odnosu na grupu feritina <100 ng/mL (Tabela 16). Choi i Pai (2001) ustanovili su da postoji inverzna korelacija između koncentracije sTfR i koncentracije feritina, time dokazuju i da sTfR zavisi od statusa gvožđa (Kotisaari i sar., 2002; Soininen i sar., 2010).

U ovom istraživanju pokazana je statistički značajna negativna povezanost sTfR i CRP u grupama bolesnika sa HBI. Na osnovu ovih rezultata dolazi se do zaključka da određivanje sTfR u prisustvu hronične inflamacije u sklopu bubrežne insuficijencije može biti pouzdaniji marker nivoa gvožđa od serumskog feritina.

U studiji Przybylowski i sar. (2010) koja je analizirala patogenetske mehanizme anemije kod bolesnika sa smanjenom GFR pronađeno je da pacijenti sa nižim vrednostima GFR imaju više vrednosti hsCRP, IL-6 i sTfR, sa sličnim nivom hepcidina. Kod ovih markera ne postoji značajnija povezanost i svi pokazuju pozitivan trend rasta sa smanjenjem GFR. Koncentracija sTfR je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom gvožđa kod bolesnika sa HBI kao i u našem ispitivanju.

Multivarijantna regresiona analiza pokazala je da su najvažniji nezavisni prediktori vrednosti sTfR vrednost hematokrita i hepcidina kod bolesnika na hemodijalizi, dok su kod predijalizne grupe nezavisni prediktori promena nivoa sTfR hepcidin i feritin. Slično je dokazano u ispitivanju Ahluwalia i sar. (1997) gde su multivarijantnom analizom pokazali da su pored feritina i hipohromni eritrociti nezavisni prediktori vrednosti sTfR.

Skikne i sar. (1990) pokazali su da nivo cirkulišućeg sTfR ukazuje na nedostatak gvožđa. U in vitro studijama pokazano je da rHuEpo može da reguliše ekspresiju sTfR na eritroidnim prekursorskim ćelijama putem IRP aktivacije (Weiss i sar., 1997). Regulisanje IRP od strane rHuEpo indirektno posredovano može da izmeni dostupnost gvožđa iz tzv. "regulatornog bazena gvožđa", koji se smatra odgovornim za IRP aktivnost. Povećano stvaranje hema nakon terapije rHuEpo, i posledično smanjenje gvožđa u regulatornom

bazenu, izazva e konformacione promene IRP i pove anje afiniteta IRE vezanja, a samim tim i ja u ekspresiju TfR (Skikne i sar., 1990).

Analiza ROC krivom je pokazala da jedino sTfR ima prediktivnu vrednost za saturaciju transferina od 30% kod svih ispitanika, dok je kod bolesnika na hemodijalizi prediktivna vrednost pokazana za feritin i sTfR.

U ispitivanju Tonbul i sar. (1998) vrednosti koncentracije sTfR zna ajno su povezane sa vrednostima koncentracije feritina, kao i hipohromnim Er i saturacijom transferina kod pacijenata na dijalizi, a koji su na terapiji rHuEpo i gvož em. Oni su predložili sTfR kao pouzdan marker nedostatka gvož a tokom terapije rHuEpo. Druge studije su pokazale odnos sTfR i feritina kao logaritamski izraz TFR-feritinski indeks, kao bolji marker u odnosu na bazalne vrednosti sTfR za identifikaciju pacijenata sa deficitom gvož a (Choi i Pai, 2001; Kotisaari i sar., 2002; Soininen i sar., 2010).

U ispitivanju Yen-Cheng i sar. (2006) kod pacijenata na hroni nom programu hemodijalize, sa serumskim feritinom nižim od 800 ng/L, na terapiji rHuEPO u trajanju dužem od 6 meseci i uz suplemente intravenskog gvož a tokom 5 meseci, analizirani su rutinski testovi statusa gvož a (serumski feritin i saturacija transferina, TfR-F indeks dobijen odnosom rastvorljivog TfR i nivoa feritina, hematokrit, hemoglobin, broj eritrocita i hsCRP). Od 100 bolesnika njih 52 su pozitivno odgovorili na terapiju, što se potvr uje pove anjem hematokrita preko 3% i/ili smanjenjem doze rHuEPO koja obi no prevazilazi 30% od po etnih vrednosti na kraju ispitivanja. Ove kriterijume nije ispunilo 48 pacijenata. Od 52 pacijenta, samo 27% je moglo biti identifikovano upotrebom rutinskih testova kao deficijentno (feritin < 100 µg/L i/ili TSAT < 20%). Oko 63% pacijenata sa pozitivnim odgovorom je bilo identifikovano kao deficijentno preko TfR-F indeksa (>0.6), ali kod 5 (10%) pacijenata nije se mogla primeniti nijedna metoda. Analiza upotrebom ROC krive pokazala je da grani na vrednost preko 0,6 za indeks TfR-F pokazuje ve u senzitivnost (90%) za detektovanje deficijencije gvož a u odnosu na nivo feritina manji od 100 µg/L (29%) i %Sat manji od 20% (6%). Ovo ispitivanje je pokazalo važnost odre ivanja TfR-F i donešen je zaklju ak da je indeks TfR-F superioran u odnosu na ostale rutinske testove za predvi anje odgovora na primenu intravenskog gvož a kod HD pacijenata, kao i u odnosu na odre ivanje vrednost sTfR. U skladu sa rezultatima ispitivanja, studija pokazuje zna aj TfR-F indeksa kao novog pomo nog markera za procenu statusa sistemskog gvož a i za sprovo enje terapije kod HD pacijenata.

7. ZAKLJU CI

1. Broj eritocita, koncentracija hemoglobina i hematokrita u grupi pacijenata na hroni nom programu hemodijalize su statisti ki zna ajno niže u odnosu na prehemodijaliznu i kontrolnu grupu ispitanika.
2. Vrednosti eritrocitnih morfoloških parametara (MCV, MCH i MCHC) ukazuju na mikrocitnu hipohromnu anemiju.
3. Pacijenti na hroni nom programu hemodijalize imaju manje vrednosti koncentracije serumskog gvož a, UIBC, TIBC i %Sat u odnosu na ostale grupe ispitanika.
4. Koncentracija feritina je statisti ki zna ajno ve a kod hemodijaliznih pacijenata u odnosu na ostale grupe ispitanika, što potvr uje stanje inflamacije.
5. Vrednosti CRP kao markera inflamacije kod pacijenata na hroni nom programu hemodijalize su statisti ki zna ajno ve e u odnosu na ostale grupe ispitanika.
6. Koncentracije hepcidina i solubilnih transferinskih receptora su statisti ki zna ajno ve e u hemodijaliznoj grupi u odnosu na ostale grupe ispitanika.
7. Vrednosti koncentracije vitamina B₁₂ nisu se razlikovale izme u ispitivanih grupa, dok su niže vrednosti folne kiseline prisutne kod bolesnika sa HBI u odnosu na kontrolnu grupu, što potvr uje da inflamacija i uremijska intoksikacija mogu da imaju zna ajnu ulogu i u metabolizmu drugih biomolekula koji u estvuju u metabolizmu gvož a.
8. U svim ispitivanim grupama postoji zna ajna pozitivna korelacija broja eritocita sa koncentracijom hemoglobina i hematokrita, kao i pozitivna korelacija koncentracije hemoglobina sa hematokritom.
9. Kod dijaliznih i prehemodijaliznih ispitanika koncentracija serumskog gvož a pozitivno korelira sa procentom saturacije, feritinom i hepcidinom, procenat saturacije pozitivno korelira sa koncentracijom feritina i hepcidina, a koncentracija feritina pozitivno korelira sa koncentracijom hepcidina.

10. Kod dijaliznih pacijenata koncentracija solubilnih transferinskih receptora negativno korelira sa koncentracijom serumskog gvoža, procentom saturacije, feritinom i hepcidinom, a kod prehemodijaliznih bolesnika koncentracija solubilnih transferinskih receptora negativno korelira sa koncentracijom serumskog gvoža i feritinom.
11. Koncentracije hepcidina su statistički značajno veće u grupi feritina <100ng/ml i >500ng/ml, u odnosu na ostale feritinske grupe.
12. Kod bolesnika na hemodijalizi %Sat je nezavisni prediktor koncentracije serumskog gvoža i feritina.
13. Kod bolesnika na hemodijalizi vrednosti koncentracije feritina i solubilnih transferinskih receptora su nezavisni prediktori koncentracije hepcidina, a vrednosti koncentracije hematokrita i hepcidina su nezavisni prediktori koncentracije solubilnih transferinskih receptora.
14. ROC analiza je pokazala da jedino koncentracija sTfR ima prediktivnu vrednost za vrednost saturacije od 30% kod svih ispitanika, a koncentracija feritina i sTfR imaju prediktivnu vrednost za vrednost saturacije od 30% kod hemodijaliznih bolesnika.
15. Adekvatno praćenje svih relevantnih biohemijskih parametara anemije kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom još uvek je veliki izazov zbog brojnih faktora koji na njega utiču (hronična inflamacija, hipoksija, hipoalbuminemija). Do sada primenjivani biomarkeri su imali izvesna ograničenja koja su onemogućavala vrlo rano postavljanje dijagnoze i još adekvatnije praćenje terapije. Izuzetno velika primena različitih preparata gvoža, eritropoetina i neophodnost povremenih transfuzija nameću potrebu za pronalaskom ranog, efikasnog i pouzdanog biomarkera u cilju racionalizacije i još bolje individualizacije primenjenih preparata. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da određivanje koncentracije hepcidina i solubilnih transferinskih receptora u sklopu rutinskog praćenja pacijenata daje bolji uvid u metabolizam i distribuciju gvoža kod ovih pacijenata. Dokazano je da na koncentraciju hepcidina utiču inflamacija, hipoksija i hipoalbuminemija, što ukazuje da je određivanje koncentracije solubilnih transferinskih receptora pouzdaniji marker deficijencije gvoža kod pacijenata na hemodijalizi.

8. LITERATURA

Aguilera A, Selgas R. Effect of recombinant human erythropoietin on inflammatory status in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004 (5); 19:46-53.

Ahluwalia N, Skikne BS, Savin V, Chonko A. Markers of masked iron deficiency and effectiveness of Epo therapy in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 532-41.

Akmal M, Sawelson S, Karubian F, Gadallah M. The prevalence and significance of occult blood loss in patients with predialysis advanced chronic renal failure, or receiving dialytic therapy. *Clin Nephrol* 1994; 42:198-202.

Allen DA, Breen C, Yaqoob MM, MacDougall IC. Inhibition of CFU-E colon formation in uremic patients with inflammatory disease. Role of IFN-gamma and TNF-alpha. *J Invest Med* 1999; 47:204-11.

Asaba H, Bergstrom J, Lundgren G, Sorbo B, Tranaeus A, Zachrisson L. Hypersequestration of 51 Cr-labelled erythrocytes as a criterion for splenectomy in regular hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1977; 8:304-7.

Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 2009; 75(9):976-81.

Ashrafian H. Hepcidin: the missing link between hemochromatosis and infections. *Infect Immun.* 2003; 71(12):6693-7000.

Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of kidney function with anemia: the third national health and nutrition examination survey (1988–1994). *Arch Intern Med* 2002; 162:1401–8

Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin- central regulator of iron metabolism. *Eur J Haemat* 2006; 78:1-10.

Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, Chen Z, Remaley A, Stonik J et al. Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect Immun* 2002; 70:2995-3003.

Bargman J, Skorecki K. Chronic Kidney Disease. In: Fauci A, et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th edition. McGraw-Hill Companies, New York, 2008.

Baynes RD. Assessment of iron status. *Clin Biochem* 1996; 29(3):209-15.

Beutler E. Iron storage disease: Facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39(2):140-7.

Billion S, Tribout B, Cadet E, Queinnec C, Rochette J, Wheatley P, et al. Hyperhomocysteinaemia, folate and vitamin B12 in unsupplemented haemodialysis patients: Effect of oral therapy with folic acid and vitamin B12. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:455-61.

Bleackley MR, Wong AY, Hudson DM, Wu CH, Macgillivray RT. Blood iron homeostasis: newly discovered proteins and iron imbalance. *Transfus Med Rev.* 2009; 23(2):103-23.

Bright R. Cases and observation, illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. *Guys Hosp Rep* 1836; 1:338-400.

Caro J, Brown S. Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med* 1979; 93:449-8.

Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, et al. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 1988; 240:924-8.

Cavill I, Macdougall IC. Erythropoiesis and iron supply in patients treated with erythropoietin. *Erythropoiesis* 1992; 3:50-5.

Centis F, Delfini C, Agostinelli F, Barbanti I, Annibali M, Lucarelli G. Correlation between soluble transferrin receptor and serum ferritin levels following bone marrow transplantation for thalassemia. *Eur J Haematol* 1995; 54:329–33.

Charlton RW, Bothwell TH: Iron absorption. *Ann Rev Med* 1983; 34:55-68.

Chiu YW, Chang JM, Hwang SJ, Tsai JC, Chen HC. Pharmacological dose of vitamin B12 is as effective as low-dose folinic acid in correcting hyperhomocysteinemia of hemodialysis patients. *Ren Fail* 2009; 31(4):278-83.

Choi JW, Pai SH. Reticulocyte subpopulations and reticulocyte maturity index (RMI) rise as body iron status falls. *Am J Hematol* 2001; 67:130–5.

Clibon U, Bonewald L, Caro J, Roodman GD. Erythropoietin fails to reverse the anemia in mice continuously exposed to tumor necrosis factor-alpha in vivo. *Exp Hematol* 1990; 18:438-41.

Collins A, Ellefson J. Association between hematocrit level and mortality in hemodialysis patients: case study of the anemic patient. *Nephrol Nursing J.* 2000; 27:233-6.

Collins AJ. Anaemia management prior to dialysis: cardiovascular and cost-benefit observations. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:ii2-ii6.

Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, Briggs JP, Eggers PW, Lacher DA, et al. Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among US adults, 1999 to 2000. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:180-8.

Dallaglio G, Law E, Means RT Jr. Heparin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations *Blood*. 2006 1; 107(7):2702-4.

De Domenico I, Ward D, Kaplan J. Heparin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007; 117(7):1755-8.

de Zeeuw D, Hillege HL, de Jong PE. The kidney, a cardiovascular risk marker and a new target for therapy. *Kidney Int Suppl* 2005; 98:25-9.

Deighan CJ, Caslake MJ, McConnell M, Boulton-Jones JM, Packard CJ. Atherogenic lipoprotein phenotype in end-stage renal failure: origin and extent of small dense low density lipoprotein formation. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:852-62.

Descombes E, Hanck AB, Fellay G. Water soluble vitamins in chronic hemodialysis patients and need for supplementation. *Kidney Int*. 1993; 43(6):1319-28.

Desforges J, Dawson P. The anemia of renal failure. *Arch Intern Med* 1958; 100:326-32.

Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl AcadSci USA* 1995; 92:3717-20.

Dittrich S, Schillinger M, Sunder-Plassmann G, Horl W.H. Efficacy of a low dose intravenous iron sucrose regimen in peritoneal dialysis patients. *Peritoneal Dialysis International* 2002; 22:60-6.

Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fischer S, et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J Biol Chem* 1992; 267:10670-5.

Dwyer JT, Larive B, Leung J, Rocco M, Burrowes JD, Chumlea WC, et al. Nutritional status affect quality of life in hemodialysis (HEMO) study patients at baseline. *J Ren Nutr*. 2002; 12:213-3.

Eckardt KU. Erythropoietin: oxygen-dependent control of erythropoiesis and its failure in renal disease. *Nephron* 1994; 67:7-23.

Elian KM, Hoffer LJ. Hydroxocobalamin reduces hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease. *Metabolism* 2002; 51:881-6.

Eschbach J, Egrie J, Downing M. Correction of anemia of end stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1987; 316:73-8.

Eschbach J, Funk D, Adamson J. Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic hemodialysis. *N Eng J Med* 1967; 276:653-8.

Eschbach J. Erythropoietin 1991: An overview. *Am J Kidney Dis* 1991; 18A:3-9.

Eschbach JW, Cook JD, Scribner BH, Finch CA. Iron balance in hemodialysis patients. *Ann Inter Med* 1977; 87:710-3.

Eschbach WJ, Egrie CJ, Downing RM, Browne KJ, Adamson WJ. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1987; 316:73–8.

Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: An evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr* 2005; 24:16-31.

European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. Working Party for European Best Practice Guidelines for the Management of Anaemia in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14 Suppl 5:1-50.

Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Modulators of protein kinase C inhibit hypoxia-induced erythropoietin production. *Exp Hematol* 1993; 21:420-6.

Feelders R, Kuiper-Kramer E, van Eijk H. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(1): 1-10.

Fehrman-Ekholm I, Lotsander A, Logan K, Dunge D, Odar-Cederlöf I, Kallner A. Concentrations of vitamin C, vitamin B12 and folic acid in patients treated with hemodialysis and on-line hemodiafiltration or hemofiltration. *Scand J Urol Nephrol* 2008; 42(1):74-80.

Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 1982; 306:1520-8.

Finkelstein FO, Schiller B, Daoui R, Gehr TW, Kraus MA, Lea J, et al. At-home short daily hemodialysis improves the long-term health-related quality of life. *Kidney Int*. 2012; 82(5):561-9

Fishbane S, Maesaka JK. Iron management in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:319-33.

Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Gar-rick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(3):1148-53.

Foley RN, Parfrey PS, Kent GM, Harnett JD, Murray DC, Barre PE. Serial change in echocardiographic parameters and cardiac failure in the end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11:912-6.

Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Heparin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411(21-22): 1565-9.

Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35, 507.

Garneata L. Intravenous iron, inflammation, and oxidative stress: is iron a friend or an enemy of uremic patients? *J Ren Nutr*. 2008; 18(1):40-5.

Gastaldello K, Vereerstraeten A, Nzame-Nze T, Vanherweghem JL, Tielemans C. Resistance to erythropoietin in iron-overloaded haemodialysis patients can be overcome by ascorbic acid administration. *Nephrol Dial Transplant*. 1995; 10 Suppl 6:44-7.

Germain M, Ram CV, Bhaduri S, Tang KL, Klausner M, Curzi M. Extended epoetin alfa dosing in chronic kidney disease patients: a retrospective review. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(10):2146–52

Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*; 2006; 281(39):28494-8.

Goto T, Saika H, Takahashi T, Maeda A, Mune M, Yukawa S. Erythropoietin supplement increases plasma lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase levels in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; (71):213-5.

Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J Cell Biol* 1993; 123(1):89-97.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; 142(1):24-38.

Hocken AG, Marwah PK. Iatrogenic contribution to anemia of chronic renal failure. *Lancet* 1971; 1:164-5.

Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: metaanalysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316: 894–8.

Hsu CY, McCulloch CE, Curhan GC. Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: results from the third national health and nutrition examination survey. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:504–10.

Hugman A. Heparin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol.* 2006; 28(2):75-83.

Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The Solution Structure of Human Heparin, a Peptide Hormone with Antimicrobial Activity That Is Involved in Iron Uptake and Hereditary Hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002; 277:37597-603.

International Federation of Kidney Foundations. Fact sheet. Available at:<http://www.associationhq.com>. Accessed November 1, 2006

Iseki K. Factors influencing the development of end-stage renal disease. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9:5-14.

Jadoul M, Vanrenterghem Y, Foret M, Walker R, Gray SJ. Darbepoetin alfa administered once monthly maintains haemoglobin levels in stable dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(4):898–903.

Jairam A, Das R, Aggarwal PK, Kohli HS, Gupta KL, Sakhuja, et al. Iron status, inflammation and heparin in ESRD patients: The confounding role of intravenous iron therapy. *Indian J Nephrol* 2010; 20 (3):125-31.

Johnson RA, Cook CA, Furmanski P. In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor- α (TNF- α): Reversal with exogenous erythropoietin. *Exp Hematol* 1990; 18:109-15.

Kalantar-Zadeh K, Kleiner M, Dunne E, Ahern K, Nelson M, Koslowe R, et al. Total iron-binding capacity-estimated transferrin correlates with the nutritional subjective global assessment in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 263–72.

Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:141–9.

Kaplan LN, Mamer OA, Hoffer LJ. Parenteral vitamin B12 reduces hyperhomocysteinemia in end-stage disease. *Clin Invest Med* 2001; 24:5-11.

Kato A, Tsuji T, Luo J, Sakao Y, Yasuda H, Hishida A. Association of proheparin and heparin-25 with erythropoietin response and ferritin in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2008; 28: 115–21.

Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamati T, Said JW, Koefler HP. Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275(22): 16618-25.

Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999; 274(30): 20826-32.

Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2009; 19(1):73-7.

Kazmi WH, Kausz AT, Khan S, Abichandani R, Ruthazer R, Obrador GT, et al. Anemia: an early complication of chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(4):803-12.

KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Kidney International* 2012; Suppl (2):279-329.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), 2004.

Klassen DK, Spivak JL. Hepatitis-related hepatic erythropoietin production. *Am J Med* 1990; 89:684-6.

Kleiner MJ, Van Wyck DB, Kaupke CJ, Kirilin LF. The role of iron and other factors in patients unresponsive to EPO therapy. *Semin Dial* 1995; 8:29-34.

Kooistra MP, van Es A, Struyvenburg A, Marx JJM. Low iron absorption in erythropoietin-treated hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:543.

Kotisaari S, Romppanen J, Penttila I, Punnonen K. The Advia 120 red blood cells and reticulocyte indices are useful in diagnosis of iron-deficiency anemia. *Eur J Haematol* 2002; 68:150-6.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991; 77:2497-500.

Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly-disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters* 2000; 480:147-50.

Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, et al. Pro-hepcidin: Expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 2004; 53:735-43.

Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrin* 2005; 184:361-70.

Kurtz A: Erythropoietin: structure, function and origin. *Adv Nephrol* 1987; 2:371-8.

Lee EY, Kim JS, Lee HJ, Yoon DS, Han BG, Shim YH, et al. Do dialysis patients need extra folate supplementation? *Adv Perit Dial* 1999; 15:247-50.

Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 1999; 21(4):396-9.

Liaugaudas G, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg ICH, Bostom AG. Renal insufficiency vitamin B(12) status, and population attributable risk for midl hyperhomocysteinemia amongcoronarz artery disease patients in the era of folic acid-fortified cereal grain flour. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:849-51.

Lindsay RM, Burton JA, Edward N, Dargle JH, Prentice CRM, Kennedy AC. Dialyzer blood loss. *Clin Nephrol* 1973; 1:29-34.

Liu J, Rosner MH. Lipid abnormalities associated with end-stage renal disease. *Semin Dial* 2006; 19(1):32-40.

Locatelli F, Pisoni LR, Combe C, Bommer J, Anreucci VE, Piera L, et al. Anemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice. Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:121-32.

Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: The CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7):1918-27.

Loose M, Patient R. Global genetic regulatory networks controlling hematopoietic cell fates. *Curr Opin Hematol* 2006; 13(4):229-6.

Loose M, Swiers G, Patient R. Transcriptional networks regulating hematopoietic cell fate decisions. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(4):307-4.

Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 2003; 101(10):4148-54.

Macdougall IC, Allen DA, Cavill I, Baker LRI, Raine AEG. Poor response to erythropoietin in inflammatory conditions may be mediated by interleukin-6. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:1033.

Madan A, Lin C, Hatch SL, Curtin PT. Regulated basal, inducible and tissue-specific human erythropoietin gene expression in homogenic mice requires multiple cis DNA sequences. *Blood* 1995; 85:2735-1.

Mahdavi MR, Makhloogh A, Kosaryan M, Roshan P. Credibility of the measurement of serum ferritin and transferrin receptor as indicators of iron deficiency anemia in hemodialysis patients *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(10):1158-62.

Maiorca R, Cancarini GC, Brunori G, Camerini C, Manili L. Morbidity and mortality of CAPD and hemodialysis. *Kidney Int* 1993; Suppl.40:S4-15.

Małyszko J, Małyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M. Is Heparin a Link between Anemia, Inflammation and Liver Function in Hemodialyzed Patients? *Am J Nephrol* 2005; 25:586–90.

Malyszko J, Mysliwiec M. Heparin in anemia and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30:15-30.

McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin.* 2004; 20:1501-10.

Means RT, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992; 80:1639-47.

Mitrache C, Passweg JR, Libura J, Petrikos L, Seiler WO, Gratwohl A, et al. Anemia: an indicator for malnutrition in the elderly. *Ann Hematol* 2001; 80:295–8.

Miyajima H. Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology* 2003; 23(4):345-50.

Muñoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(37):4617-26.

Murphy ST, Parfrey PS. The impact of anemia correction on cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Semin Nephrol.* 2000; 20:350-5.

Nangaku M, Eckardt KU. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 2006; 26(4):261–8.

National Anemia Action Council. Anemia: a hidden epidemic. Available at <http://www.anemia.org/>. Accessed on June 23, 2006

National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines 2000 update. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(suppl 1):S1-S238.

National Kidney Foundation. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1-S266.

Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring A, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 2006; 107(1):328-33.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux L, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *PNAS* 2001; 98:8780-5.

Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29:327-35.

NKF-DOQI clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:S192-S236.

NKF-K/DOQI clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease. Update 2006. *Am J Kidney Dis* 2006; 48[Suppl 1]: S3–S90.

NKF-K/DOQI clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease. Update 2000. *Am J Kidney Dis* 2001; 37[Suppl 1]: S182–S238.

Ono K, Hisasue Y. Is folate supplementation necessary in hemodialysis patients on erythropoietin therapy. *Clin Nephrol* 1992; 38(5):290-2.

Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006; 108(12):3730-5.

Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology Appl Pharmacol* 2005; 202:199-211.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276(11):7806–10.

Pennell P, Leclercq B, Delahunty MI, Walters BA. The utility of non-HDL in managing dyslipidemia of stage 5 chronic kidney diseases. *Clin Nephrol* 2006; 66(5):336-47.

Pertosa G, Simone S, Corciulo R, Pontrelli P. Hepcidin serum levels, functional iron deficiency and erythropoietin hyperresponsiveness in hemodialysis and peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:476.

Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* 2009; 11;113(24):6225-36.

Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(3):848-53.

Pigeon C, Liyn G, Courseloud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811-9.

Pollock CA, Wyndham R, Collet PV, Elder G, Field MJ, Kalowski S, et al. Effects of erythropoietin on the lipid profile in end-stage renal failure. *Kidney Int* 1994; 45:897-902.

Powe NR, Griffiths RI, Watson AJ, Anderson GF, de Lissovoy G, Greer JW, et al. Effect of recombinant erythropoietin on hospital admissions, readmissions, length of stay, and costs of dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4:1455-65.

Powers JS, Krantz SB, Collins JC, Meurer K, Failing A, Buchholz T, et al.. Erythropoietin response to anemia as a function of age. *J Am Geriatr Soc* 1991; 39:30-2.

Prata MM, Madeira C, Vicente O, Miguel MJ. Lipid profile in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(9):2345-7.

Provenzano R, Bhaduri S, Singh AK, PROMPT Study Group. Extended epoetin alfa dosing as maintenance treatment for the anemia of chronic kidney disease: the PROMPT study. *Clin Nephrol* 2005; 64(2):113-23.

Przybylowski P, Malyszko J, Malyszko JS, Koc-Zorawska E, Sadowski J, Mysliwiec M. Anemia in Heart and Kidney Allograft Recipients: Is There a Role for Hepcidin? *Transplantation Proceedings* 2010; 42:4255-8.

Rachelle B, Jennifer Z, Juhi P, Deborah B, Mehdi R, Csaba PK, et al. Total Iron-Binding Capacity and Its Changes Over Time with Nutritional and Clinical Outcomes in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol*. 2009; 29(6): 571-81.

Radtke H, Rege A, LaMarche M, Bartos D, Campbell R, Fisher J. Identification of spermine as an inhibitor of erythropoiesis in patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* 1980; 67:1623-9.

Ramos R, Martinez - Castelao A. Lipoperoxidation and hemodialysis. *Metabolism* 2008; (10):1369-74.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Hematopoezni sustav. U: *Farmakologija*. Peto izdanje. Prvo hrvatsko izdanje. Golden-marketing-Tehnicka knjiga, Zagreb 2006; 330-9.

Rebollo P, Ortega F, Baltar JM, Alvarez-Ude F, Alvarez Navascues R, Alvarez-Grande J. Is the loss of health-related quality of life during renal replacement therapy lower in elderly patients than in younger patients?. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1675-80.

Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 2005; 106:2196–9.

Robinson K, Gupta A, Dennis V, Arheart K, Chaudhary D, Green R, et al: Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996; 94:2743-8.

Roger SD, McMahon LP, Clarkson A, Disney A, Harris D, Hawley C, et al. Effects of early and late intervention with epoetin alpha on left ventricular mass among patients with chronic kidney disease (stage 3 or 4): results of a randomized clinical trial. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:148-56.

Rosenmund A, Binswanger U, Straub PW. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity, and splenic hemolysis in hemodialyzed uremic patients. *Ann Intern Med* 1975 ;82(4):460-5.

Rossert J, Froissart M. Role of anemia in progression of chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 2006; 26:283-9.

Samouilidou EC, Karpouza AP, Kostopoulos V, Bakirtzi T, Pantelias K, Petras D, et al. Lipid abnormalities and oxidized LDL in chronic kidney disease patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Ren Fail* 2012; 34(2):160-4.

Schooley JC, Kullgren B, Allison AC. Inhibition by interleukin-1 of the action of erythropoietin on erythroid precursors and its possible role in the pathogenesis of hypoplastic anemias. *Br J Haematol* 1987; 67:11-7.

Siamopoulos KC, Gouva C, Katopodis KP, Tzallas C, Nikolopoulos P, Papavasiliou EC, et al. Long-term treatment with EPO increases serum levels of high-density lipoprotein in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2006 Aug; 48(2):242-9.

Silverberg D. Outcomes of anemia management in renal insufficiency and cardiac disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:ii7-ii12.

Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75:1870-6.

Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(3):215-24.

Soininen K, Punnonen K, Matinlauri I, Karhapa P, Rehu M. Transferrin receptor expression on reticulocytes as a marker of iron status in dialyzed patients. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(9):1239–45.

Spivak JL: Erythropoiesis, Iron, and Epoetin Alfa Therapy. Mount Vernon, medcom, 1997.

Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(Suppl.7):36–40.

Su MA, Trenor CC, Fleming JC, Fleming MD, Andrews NC. The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* 1998; 92(6):2157-63.

Sunder-Plassman G, Horl WH. Erythropoietin and iron. *Clin Nephrol* 1997; 47:141-57.

Sunder-Plassmann G, Fodinger M, Buchmayer H, Papagiannopoulos M, Wojcik J, Kletzmayer J, et al: Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: Results of the Vienna multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1106-6.

Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* 1997; 43:1641-6.

Suzuki M, Hada Y, Akaishi M, Hiroe M, Aonuma K, Tsubakihara Y, et al. Effects of anemia correction by erythropoiesis-stimulating agents on cardiovascular function in non-dialysis patients with chronic kidney disease. *Int Heart J.* 2012; 53(4):238-43.

Swinkels DW, Wetzels JFM. Hepcidin: a new tool in the management of anemia in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:2450-53.

Szke D, Panteghini M. Diagnostic value of transferrin. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413(15–16):1184-9.

Taal M, Brenner B. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: developing renal risk scores. *Kidney Int* 2006; 70:1694-705.

Taes YE, Wuyts B, Boelaert JR, De Vriese AS, Delanghe JR. Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:387–9.

Theil EC. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr* 2003; 133(5 suppl 1):S1549-53.

Thorsdottir I, Jonsson PV, Asgeirsdottir AE, Hjaltadottir I, Bjornsson S, Ramel A. Fast and simple screening for nutritional status in hospitalized, elderly people. *J Hum Nutr Diet* 2005; 18:53–60.

Tonbul HZ, Kaya H, Selçuk NY, Tekin SB, San A, Akçay F, et al. The importance of serum transferrin receptor level in the diagnosis of functional iron

deficiency due to recombinant human erythropoietin treatment in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 1998; 30(5):645-51.

Tremblay R, Bonnardeaux A, Geadah D, Busque L, Lebrun M, Ouimet D, et al: Hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: Effects of the 12-month supplementation with hydrosoluble vitamins. *Kidney Int* 2000; 58:851-8.

U.S. Renal Data System. Available at: <http://www.usrds.org>. Accessed November 1, 2006.

U.S. Renal Data System: *USRDS 2007 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease & End-Stage Renal Disease in the United States*. Bethesda MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.

United States Renal Data System: *USRDS 1996 Annual Data Report*. Bethesda, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, April, 1996

Valderrábano F, Hörl WH, Macdougall IC, Rossert J, Rutkowski B, Wauters JP. PRE-dialysis survey on anaemia management. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:89-100.

Van Wyck DB. Management of early renal anaemia: diagnostic work-up, iron therapy, epoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(suppl 2):S36-9.

Watts C. Rapid endocytosis of the transferrin receptor in the absence of bound transferrin. *J Cell Biol* 1985; 100(2):633-7.

Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352(10):1011–23.

Weiss G, Houston T, Kästner S, Jöhrer K, Grünewald K, Brock JH. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activity of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood* 1997; 89:680-7.

Westhuyzen J, Matherson K, Tracey R, Fleming SJ. Effect of withdrawal of folic acid supplementation in maintenance hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1993; 40(2):96-9.

Westhuyzen J. Folate supplementation in the dialysis patient-fragmentary evidence and tentative recommendations. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(11):2748-50.

Wish JB. Assessing Iron Status: Beyond Serum Ferritin and Transferrin Saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1:S4–S8.

Yen-Cheng C, Szu-Chun H, Der-Cherng T. Association Between Transferrin Receptor–Ferritin Index and Conventional Measures of Iron Responsiveness in Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 2006, 47(6):1036-44.

Yeun JY, Levine RA, Mantadiluk V, Kaysen GA. C-reactive Protein Predicts All-Cause and Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(3):469-47.

Zachee P, Chew SL, Daelemans R, Lins RL. Erythropoietin resistance due to vitamin B12 deficiency. Case report and retrospective analysis of B12 levels after erythropoietin treatment. *Am J Nephrol*. 1992; 12(3):188-91.

Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E, et al. Hepcidin—A Potential Novel Biomarker for Iron Status in Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(6):1051-6.

1996 ESRD Core Indicators Project. Health Care Financing Administration, Baltimore, April, 1997

BIOGRAFIJA	
Osnovni podaci:	
Marija Jeli	
Datum i mesto ro enja:	12.11.1974. godine u Nišu
Nau na oblast i uža specijalnost:	Klini ka medicina, Klini ka biohemija
Obrazovanje	
Naziv završenog fakulteta:	Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu
Studijaska grupa:	Medicina
Datum diplomiranja:	29.12.2000. godine sa prose nom ocenom 9,08
	Ocena 10 na diplomskom ispitu
Specijalizacija	Klini ka biohemija
Datum položenog specijalisti kog ispita:	4.07.2005. godine sa ocenom 5

Rezultati nau no-istraživa kog rada:

Izabrane publikacije:

Jeli M, Cvetkovi T, Vidojko Djordjevi V, Damnjanovi G, Vlahovi P, Koci G, Djindji N, Jovovi B, Anti A. Hepcidin i poreme aji metabolizma gvož a kod bolesnika sa hroni nom bubrežnom boleš u. *Vojnosanit Pregl* 2013; 70(4):368-73.

Damnjanovi G, Jeli M, in i B, Ili S. Uperedna analiza serumskih koncentracija solubilnih formi athezivnih molekula kod bolesnika sa razli itom prezentacijom koronarne bolesti. *Vojnosanit Pregl* 2009;66(4): 265-270

Anti A, Stanojkovi Z, Ma ukanovi -Golubovi L, Jeli M. Ispitivanje faktora koagulacije u zamrznutoj svežoj plazmi inaktivisanoj primenom riboflavina i ultravioletnog zra enja. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69(1): 22-6.

Kostov M, Mijatovi Ž, Mihailovi D, Cerovi S, Stojanovi M, Jeli M. Correlation of cell cycle regulatory proteins (p53 and p16^{ink4a}) and bcl-2 oncoprotein with mitotic index and thickness of primary cutaneous malignant melanoma. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010;10(4):276-81.

Sokolovic D, Nikolic J, Kocic G, Jevtovic-Stoimenov T, Veljkovic A, Stojanovic M, Stanojkovic Z, Sokolovic DM, Jelic M. The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. *Drug Chem Toxicol.* 2013 Apr;36(2):141-8.

Izabrana saopštenja na skupovima od nacionalnog i internacionalnog zna aja:

Stanojkovi Z, Anti A, Ma ukanovi -Golubovi L, Stanojkovi M, Jeli M. Principi pripreme koncentrata trombocita. *Anestezija, Reanimacija, Transfuzija* 2010/2011; 38 (1-2): 33-41.

Anti A, Stanojkovi Z, Jeli M, Stanojkovi M. Clinical efficiency of „buffy coat” platelets treated with riboflavin and ultraviolet light (Mirasol PRT System). *Vox Sang* 2011; 101(1 Suppl): 178.

Stanojkovi Z, Anti A, Stanojkovi M, Jeli M. Effect of Mirasol-inactivated plasma on the pre-transfusion international normalized ratio. *Vox Sang* 2011; 101(1 Suppl): 178.

Antic A, Stanojkovic Z, Balint B, Jelic M. Transfusion of pathogen inactivated blood products using riboflavin and ultraviolet light 2 years of experience. *Vox Sang* 2012 ; 103 (1 Suppl): 143

Antic A, Stanojkovic Z, Jelic M. Coagulation Activity in Plasma Treated with the Mirasol (R) PRT System. *Transfusion* 2010; 50: 61A-62A.

REGULACIJA METABOLIZMA GVOŽ A, NIVO HEPCIDINA I TRANSFERINSKIH RECEPTORA KOD PACIJENATA NA HEMODIJALIZI

Sažetak

Uvod: Osnovni razlog anemije pacijenata sa hroni nim bubrežnom insuficijencijom je nedovoljna produkcija eritropoetina (EPO) od strane obolelog bubrega. Nadoknada gvož a je neophodna da bi se obezbedio odgovaraju i odgovor na terapiju EPO kod pacijenata sa HBI, zato što zahtevi za gvož em od strane koštane srži esto prevazilaze koli inu gvož a koja je trenutno na raspolaganju za eritropoezu (mereno procentom saturacije transferina) ili skladištenje gvož a (mereno serumskim feritinom). Pored gvož a, mora se obezbediti odgovaraju a nadoknada drugih glavnih supstrata i kofaktora za produkciju eritrocita, posebno vitamina B₁₂ i folata. Zato je odre ivanje markera vezanih za pra enje anemije i efekta terapije gvož em i eritropoetinom veoma važno.

Cilj: Cilj ovog ispitivanja bio je da se odrede pored standardnih biohemijskih markera kojima se prati metabolizam gvož a i novi markeri koji još uvek nemaju široku primenu, koncentracija hepcidina i solubilnih transferinskih receptora (sTfR). Da se utvrde korelacije zna ajnih anemijskih parametara i parametara metabolizma gvož a izme u svih ispitivanih grupa kao i prediktivne vrednosti koncentracije gvož a, hepcidina, sTfR i feritina kod pacijenata na hemodijalizi. Da se utvrdi senzitivnost i specifi nost prose nih vrednosti feritina, hepcidina i sTfR u klasifikaciji ispitanika na one sa saturacijom preko/ispod 30%. Proceni zna aj odre ivanja koncentracije hepcidina i sTfR u regulaciji metabolizma gvož a kod pacijenata na hemodijalizi.

Pacijenti i metode rada: Istraživanjem je obuhva eno 124 ispitanika i to 104 bolesnika sa hroni nom bubrežnom insuficijencijom od kojih je 64 bolesnika na hemodijalizi, a 40 bolesnika je u predijaliznom stadijumu. Kontrolnu grupu inilo je 20 zdravih dobrovoljaca. Pored standardnih biohemijskih markera, odre eni su parametri anemije, folna kiselina i vitamin B₁₂, parametri metabolizma gvož a, gvož e, TIBC, UIBC, saturacija transferina feritin, koncentracija hepcidina i solubilnih transferinskih receptora.

Zna aj: Do sada primenjivani biomarkeri su imali izvesna ograni enja koja su onemogu avala vrlo rano postavljanje dijagnoze anemije i još adekvatnije pra enje terapije kod pacijenata sa hroni nom bubrežnom insuficijencijom. Izuzetno velika primena razli itih preparata gvož a, eritropoetina i neophodnost povremenih transfuzija name e potrebu za pronalaskom ranog, efikasnog i pouzdanog biomarkera u cilju racionalizacije i još bolje individualizacije primenjenih preparata. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da odre ivanje koncentracije hepcidina i solubilnih transferinskih receptora u sklopu rutinskog pra enja pacijenata na dijalizi daje bolji uvid u metabolizam i distribuciju gvož a kod ovih pacijenata. Dokazano je da na koncentraciju hepcidina uti u inflamacija, hipoksija i hipoalbuminemija, što ukazuje da je odre ivanje koncentracije solubilnih transferinskih receptora pouzdaniji marker deficijencije gvož a kod pacijenata na hemodijalizi.

THE REGULATION OF IRON METABOLISM, THE LEVEL OF HEPCIDIN AND TRANSFERRIN RECEPTORS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

Summary

Introduction: The most common anemia caused in patients with chronic kidney insufficiency is reduced erythropoietin (EPO) synthesis due to the impacted kidneys. Iron supplementation is essential in order to provide adequate EPO therapy response in patients with CKD because bone marrow's demands for iron often exceed the amount of needed iron required for erythropoiesis (transferrin saturation percentage) or iron stores (serum ferritin). Apart from iron, sufficient amount of other main substrates and cofactors must be supplemented for erythrocyte synthesis, especially vitamin B₁₂ and folates. Markers for monitoring anemia status, as well as iron and erythropoietin therapy effects identification is of vital importance.

Aim: The aim of this research is to identify not only the standard biochemical markers, but also the new markers for iron metabolism status regulation, currently not widely used, hepcidin and soluble transferrin receptor concentration; correlation of significant anemia parameters and iron metabolism parameters in targeted groups of patients; to determine the predictive value of iron concentration, hepcidin, sTfR and ferritin concentration values in patients on hemodialysis; to determine mean ferritin, hepcidin and sTfR value sensitivity and specificity in patients with saturation values over/below 30%; to estimate the significance of hepcidin and sTfR in iron metabolism regulation in patients on hemodialysis.

Patients and methods: This research covered 124 patients, 104 with chronic kidney disease - 64 on hemodialysis and 40 in predialysis stage. Control group included 20 healthy volunteers. In addition to the standard biochemical markers, anemia parameters, folic acid and vitamin B₁₂, iron metabolism parameters, iron, TIBC, UIBC, transferrin saturation, ferritin, hepcidin and soluble transferrin receptor concentration were determined.

Importance: Up till now the applied biomarkers had certain limitations which didn't allow making an early anemia diagnosis and a more adequate therapy control in patients with chronic kidney insufficiency. An extremely huge deployment of different iron products, erythropoietins and vital periodic transfusions demands for finding an early, efficient and reliable biomarker for good rationalization and even better individualisation of the applied products. The results of the research show that hepcidin and soluble transferrin receptor concentration values as part of regular dialysis patient control greatly improves the understanding of iron metabolism and distribution in these patients. It has been proved that hepcidin concentration is influenced by inflammation, hypoxia and hypoalbuminemia, allowing soluble transferrin receptor concentration levels to be a reliable iron deficiency marker in patients on hemodialysis.