

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Ústav klinické biochemie a hematologie



Studijní program: Biochemie a patobiochemie

Ing. Terezie Sedláčková

Změny metabolismu železa a jeho regulace u nemocných v konečné fázi onemocnění ledvin léčených hemodialýzou a transplantací ledviny

Changes in the iron metabolism and its regulation in patients with end-stage renal disease treated by hemodialysis and kidney transplantation

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Plzeň 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni 25. 6. 2013

Terezie Sedláčková

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

SEDLÁČKOVÁ, Terezie. Změny metabolismu železa a jeho regulace u nemocných v konečné fázi onemocnění ledvin léčených hemodialýzou a transplantací ledviny. [Changes in the iron metabolism and its regulation in patients with end-stage renal disease treated by hemodialysis and kidney transplantation]. Plzeň, 2013. 78 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni, Ústav klinické biochemie a hematologie. Vedoucí práce Racek, Jaroslav.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. MUDr. Jaroslavu Rackovi, DrSc. za cenné připomínky a rady, kolektivu Ústavu klinické biochemie a hematologie za výraznou pomoc, pracovníkům Kliniky nefrologie Institutu klinické a experimentální medicíny za sběr vzorků a dat, ing. Stanislavu Kormundovi za statistické zpracování části práce a mojí rodině za veškerou podporu.

SOUHRN

Železo je důležitý biogenní stopový prvek, který se v organismu významně účastní mnoha buněčných pochodů. Zároveň se však díky svým vlastnostem může účastnit tzv. Fentonovy reakce, při které vzniká toxický hydroxylový radikál. Jeho vzniku je třeba zabránit, a proto je metabolismus železa v organismu velice pečlivě regulován. Na buněčné úrovni se regulace účastní systém IRPs-IREs (Iron Responsive Proteins-Iron Responsive Elements) a na systémové úrovni se regulace účastní peptidový hormon hepcidin.

Hepcidin byl objeven v roce 2000 jako peptid s antimikrobiálními vlastnostmi. Později se ukázalo, že hraje klíčovou roli v regulaci metabolismu železa. Cílem účinku hepcidinu je ferroportin-jediný buněčný exportér železa. Exprese hepcidinu je snižována anémií a hypoxií a zvyšována nadbytkem železa a zánětem.

Hemodialyzovaní pacienti často trpí anémií, která je způsobena mnoha faktory, např. nedostatečnou tvorbou erythropoetinu, chronickým zánětem, chronickým oxidačním stresem, krevními ztrátami při hemodialýze či sníženou životností červených krvinek.

Na našem pracovišti jsme provedli celkem tři studie na pacientech s terminálním onemocněním ledviny a naším cílem bylo zjistit vztah hepcidinu a dalších parametrů metabolismu železa, zánětu a erythropoesy. Předpokládali jsme, že tento vztah bude úzký.

Naše výsledky ukázaly, že hodnocení stavu metabolismu železa u pacientů s terminálním onemocněním ledviny je poměrně obtížné. Očekávali jsme, že hepcidin, považovaný i za jeden z markerů zánětu, bude kopírovat hladiny zánětlivých ukazatelů, jako jsou CRP a IL-6. Zároveň se předpokládalo, že bude existovat závislost mezi úrovní glomerulární filtrace nebo reziduální funkce ledvin a hladinou hepcidinu. Hladiny hepcidinu a zánětlivých markerů byly sice vyšší u hemodialyzovaných pacientů ve srovnání s kontrolními osobami, mezi těmito parametry se ale jak u pacientů, tak u kontrol neprokázala žádná výrazná asociace; pokud existovala korelace, byla slabá.

Zdá se, že hladina hepcidinu u hemodialyzovaných pacientů je ovlivněná celou řadou faktorů, které na ni působí komplexně. Určitě mezi ně patří zánět, který ale možná nemá nejzásadnější vliv, dále třeba i anémie, hypoxie, retence hepcidinu, tvorba hepcidinu tukovou tkání při zlepšení nutričního stavu, snaha zabránit infekci, diurnální variabilita hepcidinu či jeho intra-individuální variabilita. V budoucnu bude také třeba dořešit preanalytické, analytické a klinické aspekty stanovení hepcidinu. Až se podaří toto vyřešit, bude teprve možné opravdu říci, jak moc užitečný je hepcidin v posouzení stavu metabolismu železa v organismu. Snahy pro zlepšení této situace jistě budou sílit, protože už nyní je hepcidin zkoumán i v řadě jiných oborů než jen v nefrologii či hematologii.

SUMMARY

Iron is a very important biogenous trace element, which is involved in many of cell processes in organism. For its character iron can be also involved in Fenton reaction, where a toxic hydroxyl radical is produced. The iron metabolism is very carefully regulated in order to avoid formation of hydroxyl radical. Iron Responsive Proteins-Iron Responsive Elements (IRPs-IREs) system is involved in the regulation of iron metabolism on cell level, small peptide hormon hepcidin is involved in the regulation on systemic level.

Hepcidin was discovered in 2000 as a peptide with antimicrobial properties. It is a key regulator of iron metabolism, as was discovered later. The target of hepcidin is ferroportin- the only known iron cell exporter. The expression of hepcidin is downregulated by hypoxia and anemia and upregulated by iron overload and inflammation.

Hemodialyzed patients suffer from anemia very often. This anemia is caused by many factors, e.g. inadequate production of erythropoietin, chronic inflammation, chronic oxidative stress, blood loss during hemodialysis process or lower lifetime of red blood cells.

We realized three studies on the patients with end-stage renal disease in our laboratories. Our aim was to find a relationship of hepcidin and other parameters of iron metabolism, inflammation and erythropoiesis. We expected that this relationship should be close.

Our results showed, that the evaluation of iron metabolism status in patients with end-stage renal disease is quite difficult. We expected that hepcidin, which is considered to be one of the inflammatory markers, would copy the levels of other parameters of inflammation as CRP and IL-6. We also expected, that the relation between glomerular filtration or residual kidney function and hepcidin level would exist. The levels of hepcidin and inflammatory markers were higher in hemodialyzed patients compared to the healthy controls, but no strong correlation between these parameters was found.

The hepcidin level in patients with end-stage renal disease seems to be influenced by many factors, which effect complexly. It is inflammation, which is maybe not the most crucial factor, anemia, hypoxia, hepcidin retention, production of hepcidin by the fat tissue in patients with better nutritional status, defence against infection, diurnal variability of hepcidin or its intra-individual variability. There is necessary to solve some preanalytical, analytical and clinical aspects of hepcidin estimation in future. Then we will be able to consider the usefulness of hepcidin determination. The efforts for improvement of this situation will be stronger, because hepcidin is investigated in the other medical fields than only in nephrology or hematology at the moment.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Železo	3
2.1.1	Základní fyzikálně-chemické vlastnosti železa	3
2.1.2	Biologický význam železa	3
2.1.3	Metabolismus železa.....	4
2.1.4	Přehled hospodaření organismu se železem.....	4
2.1.5	Důležité proteiny v metabolismu železa	7
2.1.6	Regulace metabolismu železa.....	11
2.2	Hepcidin	13
2.2.1	Regulace syntézy hepcidinu.....	15
2.2.2	Role hepcidinu v anémiích	17
2.2.3	Choroby spojené s pozměněnou expresí hepcidinu	18
2.2.4	Stanovení hepcidinu.....	21
2.2.5	Možné léčebné strategie	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1	Hypotézy a cíle.....	26
3.2	Pilotní studie Hepcidin u hemodialyzovaných pacientů.....	27
3.2.1	Pacienti	27
3.2.2	Kontroly.....	28
3.2.3	Biochemická měření.....	28
3.2.4	Statistika	28
3.2.5	Výsledky	28
3.3	Studie Hepcidin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů	29
3.3.1	Pacienti	29
3.3.2	Kontroly.....	29
3.3.3	Biochemická měření.....	30

3.3.4	Statistika	30
3.3.5	Výsledky	30
3.4	Studie Hepcidin u pacientů po transplantaci ledviny	34
3.4.1	Design studie	34
3.4.2	Charakteristika souboru pacientů	34
3.4.3	Odběr biologického materiálu a provedená stanovení	36
3.4.4	Vyhodnocení výsledků	37
3.4.5	Výsledky	37
3.5	Diskuse	50
4	ZÁVĚR.....	57
5	SEZNAM LITERATURY	61
6	SEZNAM ZKRATEK.....	69

1 ÚVOD

Železo je nejrozšířenější přechodný prvek na Zemi, který lidstvo odnepaměti využívá jako technicky nejvýznamnější kov. Železo je ale také velice důležitý biogenní stopový prvek, který se v organismu účastní celé řady buněčných pochodů, např. přenosu kyslíku, buněčného dýchání, buněčné proliferace a diferenciaci či regulace genové exprese a modulace imunitního systému. Železo je přechodný prvek a může se tedy vyskytovat ve více mocenstvích, což mu propůjčuje charakter volného radikálu. Železo samo se navíc reakcí volných radikálů aktivně účastní. Železnatý ion se uplatňuje v tzv. Haber-Weiss-Fentonově sekvenci, kde vzniká velmi reaktivní a toxický hydroxylový radikál, který může závažně poškodit organismus. Této reakci se snaží organismus zabránit. Proto je metabolismus železa v organismu velmi pečlivě regulován tak, aby byl dostatek železa pro erythropoiesu, ale zároveň aby nikde nebylo volné železo, a to i z toho důvodu, že volné železo využívají pro svůj růst bakterie.

Regulace metabolismu železa probíhá na buněčné i na systémové úrovni. Na buněčné úrovni je do regulace zapojen systém IRPs-IREs (Iron Responsive Proteins-Iron Responsive Elements), který podle potřeby a aktuální hladiny železa iniciuje tvorbu proteinů, které vážou či přenášejí železo. Na systémové úrovni se regulace metabolismu železa účastní malý peptidový hormon složený z pouhých 25 aminokyselin, který se nazývá hepcidin. Cílem působení molekuly hepcidinu je molekula jediného dosud známého exportéru železa z buňky ferroportinu; vazbou na ferroportin se železo nemůže exportovat a zůstává uzamčeno uvnitř buňky. Exprese hepcidinu je snižována při anémii a hypoxii, zvyšována je při nadbytku železa v organismu a při zánětlivém stavu.

Pacienti s chronickým selháním ledvin v terminálním stadiu často trpí anémií, která je způsobena mnoha faktory – nedostatečnou tvorbou erythropoetinu nemocnými ledvinami, sníženou dobou přežívání červených krvinek v důsledku dialyzační procedury a chronického oxidačního stresu, krevními ztrátami při dialýze, retencí uremických toxinů inhibujících proliferaci buněk a také nevyužitelností železa v důsledku chronického zánětu. Chronický zánět totiž podněcuje tvorbu hepcidinu, který způsobí uzamčení železa v buňkách a tím jeho nedostupnost. V laboratorním nálezu takových pacientů pak dominuje anémie a hyperferritinémie.

Z hepcidinu se tedy stává velmi populární molekula, kterou mají v hledáčku vědecké týmy nejen z oblasti nefrologie a hematologie, ale třeba i gastroenterologie, gynekologie či

neonatologie. Velmi lákavé by bylo nalezení cíle pro možnou terapii anémií a zánětlivých stavů a tím i zlepšení kvality života nemocných.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Železo

Železo (lat. ferrum, chemická značka Fe) je nejrozšířenější přechodný prvek na Zemi. Jeho hmotnostní zlomek v zemské kůře je 4,7-6,2% a vyskytuje se zde převážně ve formě minerálů. Vzhledem k tomu, že jde o technicky nejvýznamnější kov, je jeho využití obrovské. Železo je ale také velmi významným biogenním prvkem, protože se v organismu podílí na nejrůznějších buněčných pochodech [1].

2.1.1 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti železa

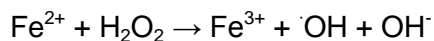
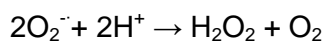
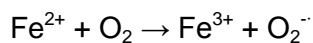
Železo je v periodické soustavě prvků umístěno v bloku d ve 4. periodě a VIII. B skupině. Jeho elektronová konfigurace je $[_{18}\text{Ar}]3d^64s^2$, to znamená, že jeho atomové číslo je 26. Atomová hmotnost železa je 55,874 g/mol. V přírodě se nacházejí čtyři izotopy železa, nejrozšířenějším izotopem je ^{56}Fe . Železo je poměrně měkký, světle šedý až bílý tvárný kov s nízkou odolností proti korozi a s poměrně nízkou pevností. Do určité teploty (tzv. Curieův bod, pro železo 1043 K) má ferromagnetické vlastnosti, při vyšší teplotě tyto vlastnosti ztrácí. Patří mezi přechodné prvky, což znamená, že má částečně zaplněný d-orbital a vyskytuje se v proměnlivých oxidačních stavech. Ve sloučeninách se vyskytuje hlavně jako Fe^{2+} a Fe^{3+} , sloučeniny Fe^{4+} a Fe^{6+} jsou velmi nestálé a prakticky se téměř nevyužívají. Elementární železo je chemicky také značně nestálé a je velmi reaktivní. Velmi snadno se rozpouští v minerálních kyselinách.

2.1.2 Biologický význam železa

Železo je pro mnohé organismy velmi důležitý biogenní stopový prvek. Je totiž obsaženo v hemu, který je součástí molekul hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů a jiných enzymů; váže se též na atom síry, jako např. v akonitase, klíčovém enzymu citrátového cyklu. Železo má tedy velmi důležitou roli v přenosu kyslíku, a tím v buněčném dýchání. Má rovněž význam pro buněčnou proliferaci a diferenciaci a pro regulaci genové exprese a své uplatnění nachází i ve funkcích imunitního systému. Železo je také součástí enzymu NADPH-oxidasy, která je velmi potřebná pro boj s mikroby.

Železo je přechodný prvek a může se tedy vyskytovat ve více mocenstvích, což mu propůjčuje charakter volného radikálu. Železo samo se navíc reakcí volných radikálů aktivně účastní. Právě železnatý ion se uplatňuje v tzv. Haber-Weiss-Fentonově sekvenci (Obr. 1), kdy Fe^{2+} iniciuje tvorbu peroxidu vodíku, který pak oxiduje ion přechodného kovu v nižším oxidačním stavu za vzniku velmi reaktivního a toxického hydroxylového radikálu,

který může závažně poškodit organismus [2]. Organismus se snaží této reakci zabránit, přičemž využívá zbraně v podobě katalasy či glutathionperoxidasy, ale především se snaží metabolismus železa v organismu velmi pečlivě regulovat.



Obr. 1: Haber-Weiss-Fentonova sekvence

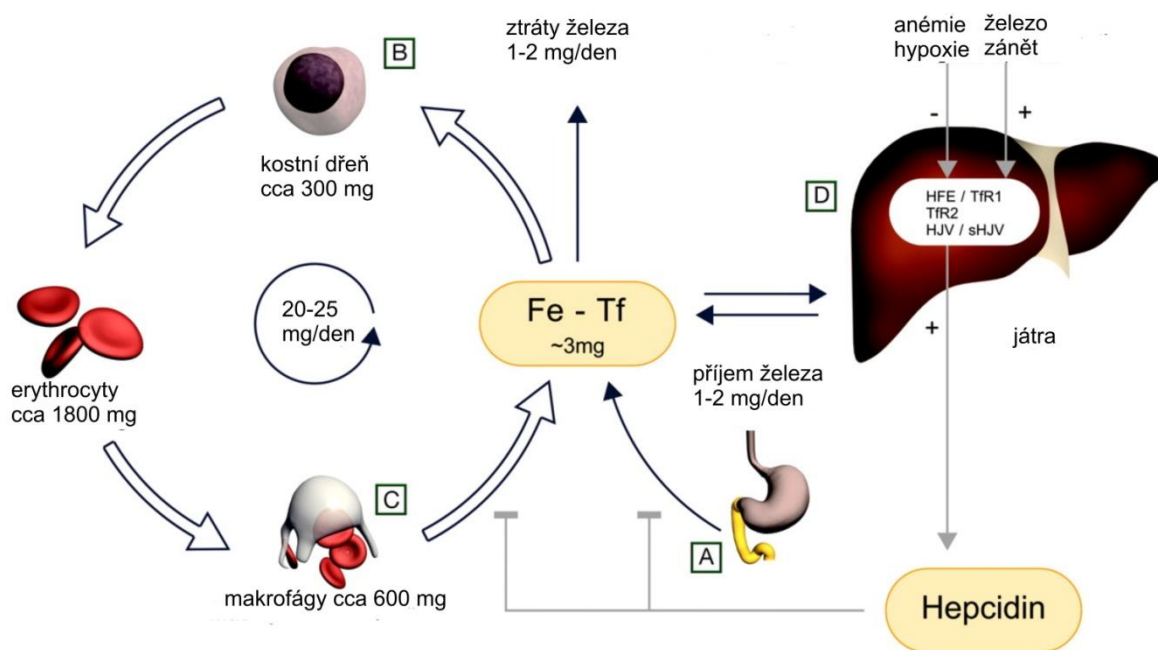
2.1.3 Metabolismus železa

Regulace metabolismu železa probíhá tak, aby bylo železa dostatek pro erythropoesu, ale aby se zároveň nikde nevyskytovalo ve formě Fe^{2+} . Regulace probíhá jak na buněčné, tak na systémové úrovni. V organismu jsou obsaženy asi 4 gramy železa v různých formách – vázané v hemu, vázané na síru, vázané na bílkoviny a na nízkomolekulární cheláty. Množství železa v organismu je v podstatě stálé, protože denní příjem železa jen vyrovnává denní ztráty železa způsobené např. deskvamací buněk či krevními ztrátami; jinak je železo v organismu vlastně recyklováno. Neexistuje žádný mechanismus, kterým by mohlo docházet k vylučování přebytečného železa z organismu. Proto je vzhledem k nebezpečí, které v sobě železo skrývá, jeho metabolismus velmi přísně řízen řadou bílkovin a peptidů. Dalším důvodem pro velice přísnou regulaci je fakt, že bakterie využívají železo ke svému růstu a dokážou ho přijímat i tam, kde je ho jen velmi málo [3].

2.1.4 Přehled hospodaření organismu se železem

Přehled hospodaření organismu se železem ukazuje Obr. 2.

Železo se do organismu dostává z potravy. Je vstřebáno kartáčovým lemem enterocytů duodena v hemové i nehemové podobě (A). Toto železo je transportováno do kostní dřeně a využito pro erythropoesu (B). Železo ze stárnoucích červených krvinek je recyklováno v makrofázích (C) a opětovně dopraveno do kostní dřeně, přičemž tento obrat hraje v zásobách železa největší roli. Jako zásobárna železa fungují játra a právě makrofágy. Regulace metabolismu železa probíhá jak na buněčné, tak na systémové úrovni. Na buněčné úrovni se zapojuje systém IRPs-IREs (Iron responsive proteins – Iron responsive elements), klíčový pro expresi ferritinu a transferrinu, proteinů důležitých pro skladování a transport železa. Na systémové úrovni dochází ke kontrole metabolismu železa prostřednictvím hepcidinu (D), viz Obr. 2.[4].



Obr. 2: Přehled metabolismu železa v organismu [4]

2.1.4.1 Metabolismus železa v enterocyty (Obr. 3A)

Železo je v potravě obsažené buď v anorganické formě Fe^{3+} ve formě rozpustných komplexů železa (především z rostlinné stravy), nebo vázané na hemoglobin či myoglobin (v živočišné stravě). Železité ionty jsou pomocí enzymu DcytB (duodenal cytochrom b-like ferrereductase) a za účasti redukčních činidel, např. kyseliny askorbové či některých aminokyselin jako jsou cystein a histidin, redukovány na Fe^{2+} a posléze vstřebány do enterocyty transportérem DMT1 (divalent metal transporter 1) [5, 6]. Hem vstupuje do enterocyty po enzymatické digesci hemoglobinu či myoglobinu pravděpodobně s pomocí buněčného hemového přenašeče HCP1 (heme-carrier protein 1). Uvnitř enterocyty je hem enzymaticky degradován hemoxygenasou za uvolnění Fe^{2+} [6,7]. Takto uvolněné železo se váže v trojmocné formě do molekuly ferritinu a slouží tak případně jako intracelulární pool železa. K uvolnění železa ve formě Fe^{2+} z enterocyty dochází prostřednictvím molekuly FPN-1 (ferroportin). Takto exportované železo je ihned oxidováno hefestinem (membránový protein velmi podobný ceruloplasminu) na Fe^{3+} a je v této formě navázáno na transportní protein transferrin [7,8]. Denně se takto vstřebají 1-2 mg železa a nahradí tak ztráty způsobené odlupováním buněk kůže a sliznic a krvácením.

2.1.4.2 Metabolismus železa v proerythroblastech (Obr. 3B)

Erythroidní prekursor (proerythroblasty) přebírají železo prostřednictvím tzv. transferrinového cyklu. Transferrin se váže na svůj receptor TfR1 na buněčném povrchu. Vytvoří se komplex, který je endocytózou vtažen dovnitř buňky. V endosomu dojde

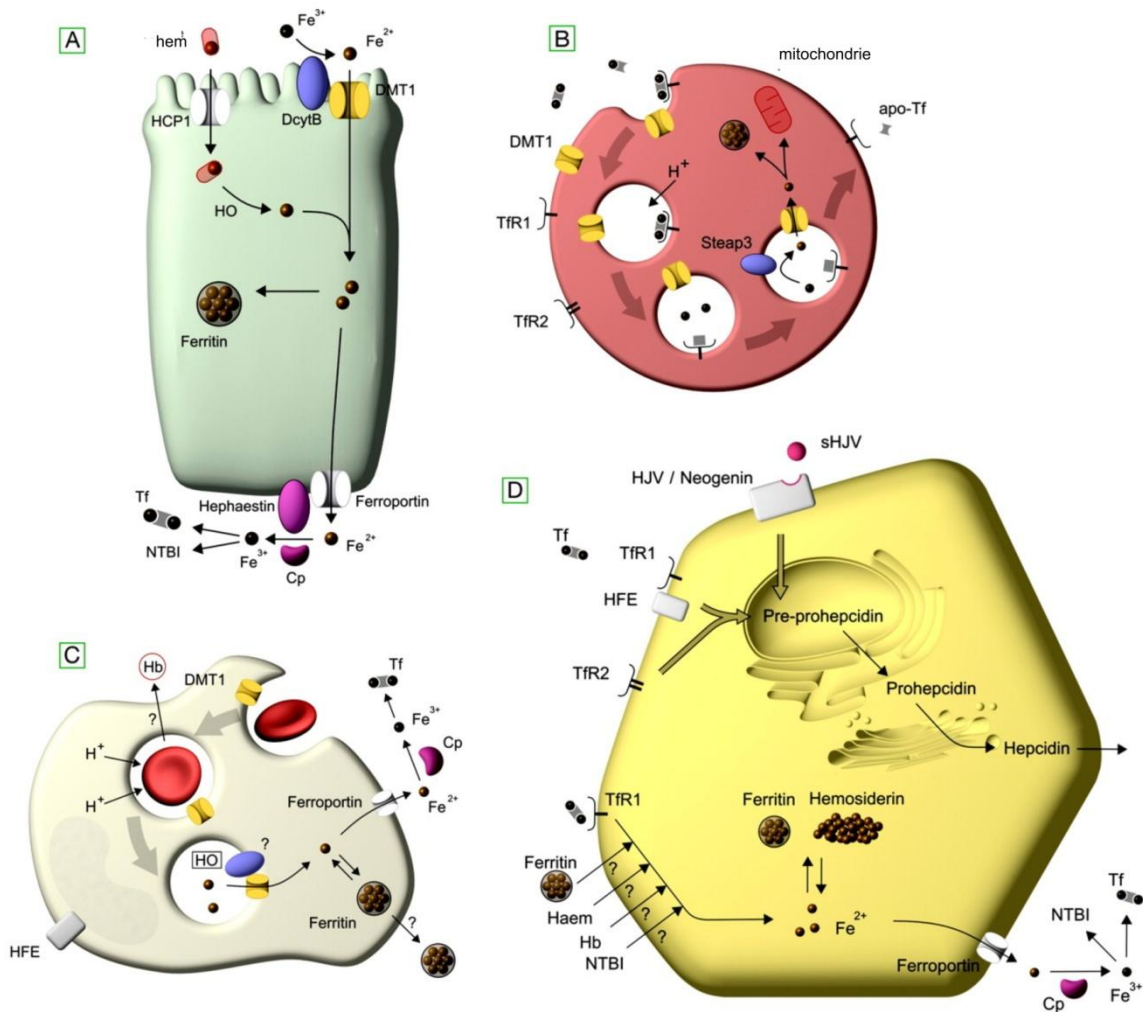
k uvolnění Fe^{3+} z transferrinu snížením pH. K redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} dochází zřejmě pomocí Steap3, a Fe^{2+} může opustit endosom pomocí DMT-1. Následně se apo-transferrin a TfR1 vrátí zpět na buněčný povrch, aby se znovu mohly podílet na transportu železa. V erythroidních prekursorech je železa třeba hlavně v mitochondriích pro jeho inkorporaci do hemu a Fe-S proteinů, přičemž lze říci, že prakticky všechno železo se váže do hemu.

2.1.4.3 Metabolismus železa v makrofágu (Obr. 3C)

Retikuloendoteliální makrofágy vychytávají stárnoucí erythrocyty, jejichž průměrná životnost je asi 120 dní, a obstarávají recyklaci železa. Stárnoucí červená krvinka je pohlcena makrofágem a dochází k její lýze v fagolysosomálním kompartmentu. Zde dojde i působením sníženého pH k degradaci hemoglobinu na hem a globin a z hemu je pomocí hemoxygenasy uvolněno železo, které pak tvoří intracelulární pool [9,10]. Retikuloendoteliální makrofágy dokážou také zpracovat hemoglobin z intravaskulárně hemolyzovaných erythrocytů – takový hemoglobin se v plazmě váže na haptoglobin a do makrofágu je přenesen prostřednictvím receptoru CD136. Železo je pak z hemu uvolněno pomocí hemoxygenasy [11]. Železo je buď uloženo ve formě ferritinu, nebo je z makrofágu exportováno ferroportinem s následnou oxidací ceruloplasminem. Pak se může železo jako Fe^{3+} vázat na transferrin, který je transportuje. Z makrofágů se uvolňuje i nezanedbatelné množství ferritinu a hemoglobinu.

2.1.4.4 Metabolismus železa v hepatocytu (Obr. 3D)

Játra jsou největší zásobárnou železa v organismu – přebývající železo v sobě ukrývají ve formě ferritinu a hemosiderinu a malou část jako biologicky aktivní intracelulární pool. Hepatocyt přijímá železo několika cestami. Pro navázání transferrinu jsou na povrchu hepatocytu receptory TfR1 a TfR2. Po navázání transferrinu na TfR1 dojde k jeho internalizaci endocytózou. Ve vzniklém endosomu dojde k uvolnění Fe^{3+} , k jeho redukci ferrireduktasou a následnému přemístění z endosomu do cytoplasmy pomocí DMT-1. Příjem železa pomocí TfR1 je regulován proteinem HFE (hemochromatosis protein), který ještě interaguje s β_2 -mikroglobulinem. Transport železa do buňky prostřednictvím TfR2 se děje zřejmě stejným mechanismem, pouze afinita receptoru TfR2 k transferrinu je oproti afinitě TfR1 mnohem nižší. Existuje zřejmě i jiný transport železa do hepatocytu, který není závislý na receptorech; molekuly, které zajišťují příjem ferritinu, hemu a hemoglobinu však ještě nebyly identifikovány. V případě, že je v organismu takový přebytek železa, že se zcela vyčerpá kapacita transferrinu, objeví se tzv. volné železo-NTBI (NonTransferrin-Bound Iron), obvykle ve formě Fe^{3+} vázané na citrát. Pak zřejmě dochází k transportu železa do hepatocytu pomocí molekul DMT-1, ZIP-14 a kalciových kanálů.



Obr. 3: Metabolismus železa v enterocyty (A), proerythroblastu (B), makrofágu (C) a hepatocyty (D) [4]

Z hepatocyty je železo exportováno pomocí ferroportinu a je následně oxidováno ceruloplasminem na Fe^{3+} a navázáno na transferrin a připraveno k dalšímu transportu [8, 9, 11].

2.1.5 Důležité proteiny v metabolismu železa

Přehled důležitých proteinů v metabolismu železa a jejich funkcí je uveden v Tab. 1 (podle [12]).

Tab. 1: Důležité proteiny v metabolismu železa a jejich funkce

Transferrin	transportuje železo mezi absorpcí, zásobami a utilizací železa, váže vysoce specificky 2 atomy trojmocného železa
Transferrinový receptor	transmembránový glykoprotein, syntéza je stimulovaná sníženým železem, je exprimovaný na všech buňkách, nejvíce na erytroidních, placenty a dělicích se buňkách
Ferritin	přítomný ve všech buňkách jako apoferritin, má 2 podjednotky: H-heavy, L-light, váže až 4 500 atomů železa, skladuje zásobní železo, plazmatický ferritin reflektuje velikost zásob Fe, zatím není známý mechanismus uvolňování Fe z ferritinu
Mitochondriální ferritin	skladuje železo v mitochondriích, jeho gen neobsahuje introny, váže železo v mitochondriích u myelodysplastického syndromu typu sideroblastické anémie
Ferrochelataza	v mitochondriích inzerce železa do protoporfyrinu a následně do hemu
Frataxin	angažovaný v exportu železa z mitochondrií
Duodenální cytochrom b (Dcytb)	funkce reduktasy trojmocného železa na membráně enterocyty
DMT-1	divalent metal transporter 1 transportuje železo v různých buňkách
Ferroportin	transportuje dvojmocné železo přes membránu enterocytů a makrofágů, regulován hepcidinem, exportuje železo z těchto buněk a předává transferrinu
Hefestin	membránový homolog ceruloplasminu na enterocyty, spolupráce s ferroportinem
Ceruloplasmin	obsahuje 6 atomů mědi, syntetizován v hepatocytech, úloha v mobilizaci železa z makrofágů
Hepcidin	peptid o 25 aminokyselinách, tvoří se v hepatocytech, nejdůležitější faktor v homeostase železa, ovlivňuje vstřebávání železa enterocyty a uvolňování železa z makrofágů
HFE	kooperace s hepcidinem, váže transferrinový receptor, mutace genu HFE vede k hereditární hemochromatose
Hemojuvelin	kooperuje s hepcidinem, mutace genu vede k závažné formě hemochromatosis
BMP 6	bone morphogenetic protein, spolu s hemojuvelinem a faktorem SMAD je součástí signální cesty hepcidinu

2.1.5.1 Ferritin

Ferritin je molekula, která „skladuje“ železo v organismu. V roce 1934 jej objevil český akademik Vilém Laufberger [13]. Jeho molekulová hmotnost je 460 kDa. Skládá se z 24 podjednotek L (L-light, též liver; 19,5 kDa, bohatý výskyt v játrech) a H (H-heavy, též heart; 21 kDa, bohatý výskyt v srdeční tkáni), které dohromady tvoří dutinu schopnou pojmout železo až o 25 % své hmotnosti, a to ve formě Fe^{3+} díky tomu, že podjednotka H má ferroxidasovou aktivitu. Železo je importováno a exportováno pomocí kanálů mezi H a L podjednotkami.

Tento intracelulární ferritin je syntetizován hladkým endoplazmatickým retikulem a uvolněn do cytosolu, kde může být později lysosomální aktivitou přeměněn v nerozpustný hemosiderin. Množství denně syntetizovaného ferritinu odpovídá požadavkům organismu na nahrazení katabolizovaného ferritinu či na uložení železa. Normální plazmatický ferritin je zřejmě syntetizován drsným endoplazmatickým retikulem a je před uvolněním do plazmy z větší části glykosylován v Golgiho aparátu. Tento plazmatický ferritin se také od intracelulárního ferritinu liší nižším obsahem uloženého železa a tím, že jeho hlavní komponentou je podjednotka L. Jeho plazmatická hladina však reflektuje hladiny intracelulárního ferritinu [14].

V mitochondriích je speciální typ ferritinu. Skládá se pouze z H-jednotky, má ferroxidasovou aktivitu a slouží k udržení homeostasy železa v mitochondriích; přesný mechanismus však není dosud znám. Mitochondrie využívají většinu metabolicky aktivního železa. Mitochondriální ferritin je mezidruhově velmi konzervovaná molekula. Jeho exprese v lidských buňkách je velmi specifická. Nejvyšší míra exprese byla nalezena ve varlatech, v ostatní tkáni není exprese tak vysoká. Geny pro mitochondriální ferritin neobsahují IREs, čímž se liší od cytoplasmatického ferritinu.

V jádře buňky je také ferritin. Ten se exprimuje podle stejné mRNA jako cytoplasmatický ferritin a je složen především z H podjednotky, což naznačuje, že slouží hlavně k ukládání železa v jádře [15].

Nízké hladiny ferritinu v séru signalizují nedostatek železa v organismu, způsobený nízkým příjmem železa či krevními ztrátami. Vysoké hladiny ferritinu jsou nacházeny např. při zánětlivých onemocněních, poškozeních tkání bohatých na železo (např. játra) nebo při stavech zhoubného bujení [14].

2.1.5.2 Hemosiderin

Hemosiderin je ve vodě nerozpustný protein. Jde zřejmě o výsledek lysosomální degradace ferritinu při nadbytku železa v organismu. Je to také zásobní forma železa, která se vyskytuje pouze uvnitř buněk, dokonce pojme i více železa než ferritin; toto železo se z něj ale mnohem hůře uvolňuje. Při jeho hromadění v organismu vzniká tzv. hemosiderosa.

2.1.5.3 Transferrin

Transferrin je plazmatický jednořetězcový glykoprotein zajišťující transport železa. Váže ho velmi pevně, avšak reverzibilně. Ačkoliv se na něj váže méně než 0,1% celkového tělesného železa, jde o nejdůležitější pool železa, protože může být rychle tam, kde je ho třeba.

Molekulová hmotnost transferrinu je 80 kDa. Obsahuje dvě strukturně podobná, avšak funkčně odlišná specifická vazebná místa pro Fe^{3+} . Afinita transferrinu k Fe^{3+} je extrémně vysoká, klesá však s klesajícím pH [16]. Transferrin, na který není vázané železo, se nazývá apo-transferrin. Za normálních okolností je všechno nehemové železo vázané na transferrin, přičemž saturace vazebných míst je kolem jedné třetiny. Při nadbytku železa v organismu a obsazení všech vazebných míst transferrinu se v organismu objevuje volné železo (NTBI – NonTransferrin-Bound Iron), a to obvykle ve formě Fe^{3+} vázané na citrát [2].

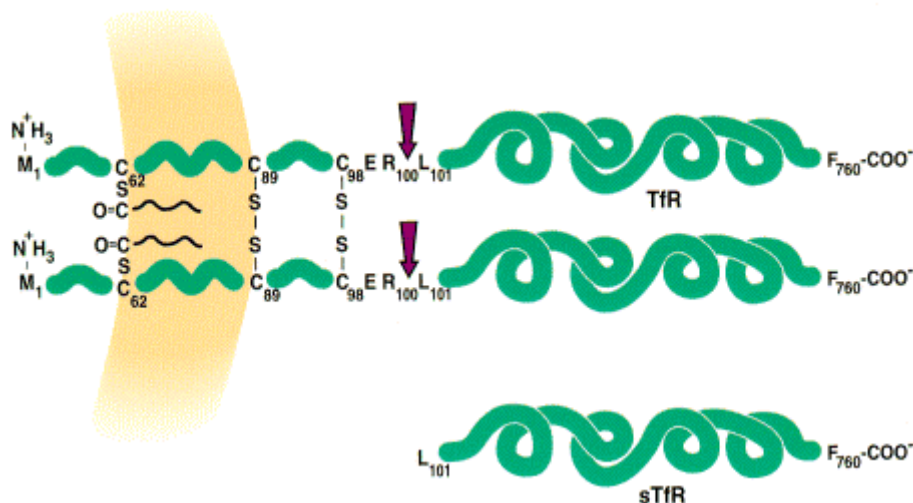
Transferriny se v organismu vyskytují v různých isoformách, v závislosti na tom, kolik řetězců kyseliny sialové se váže na protein. Převažuje forma tetrasialotransferrinu, které je za normálních okolností zhruba 80 %. Za karbohydrát-deficientní transferriny se považují asialo-, monosialo- a disialotransferrin. A právě stanovení disialotransferrinu jako zástupce karbohydrát-deficientního transferrinu se používá jako jeden z markerů abusu alkoholu.

2.1.5.4 Transferrinový receptor

Jak už bylo popsáno výše, transferrin se do buňky dostává pomocí receptorů. Receptor pro transferrin (TfR) je membránový glykoprotein složený ze dvou monomerů vzájemně propojených dvěma disulfidickými můstky s molekulovou hmotností 190 kDa. Každá jeho polypeptidová jednotka obsahuje 760 aminokyselin rozdělených následovně: 671 aminokyselin ve velké C-terminální extracelulární doméně, 28 aminokyselin v transmembránové doméně a 61 aminokyselin v N-terminální cytoplazmatické doméně. Transferrinový receptor je exprimován každou dělící se buňkou v organismu, nejvíce však v nezralé červené krvince, placentě a játrech. U zdravého dospělého člověka je 80 % TfR v kostní dřeni. Rychlost jeho syntézy je úzce spjatá s buněčnou spotřebou železa – nedostatek železa indukuje rychlou syntézu TfR, naopak nadbytek železa syntézu TfR suprimuje.

Cirkulující forma TfR byla nalezena jak v séru lidském, tak zvířecím [17]. Takzvaný solubilní transferrinový receptor (sTfR) je část monomeru normálního TfR, která postrádá prvních 100 aminokyselin a v séru cirkuluje ve formě komplexu s transferrinem [18]. Pravděpodobná konformace vypadá následovně: váží se 2 monomery receptoru s jednou molekulou transferrinu, což dá dohromady molekulovou hmotnost kolem 250 kDa. Velmi malé množství sTfR je ve formě dimeru v exosomech. Solubilní transferrinový receptor (Obr. 4) vzniká proteolytickým působením serinové proteasy na povrchu exosomu před exocytosou. Množství sTfR měřené v séru koresponduje s množstvím membránových

transferrinových receptorů a většinou pochází z erythroblastů a v menším měřítku z retikulocytů [17].



Obr. 4: Solubilní transferrinové receptory [19]

2.1.6 Regulace metabolismu železa

2.1.6.1 Regulace metabolismu železa na buněčné úrovni

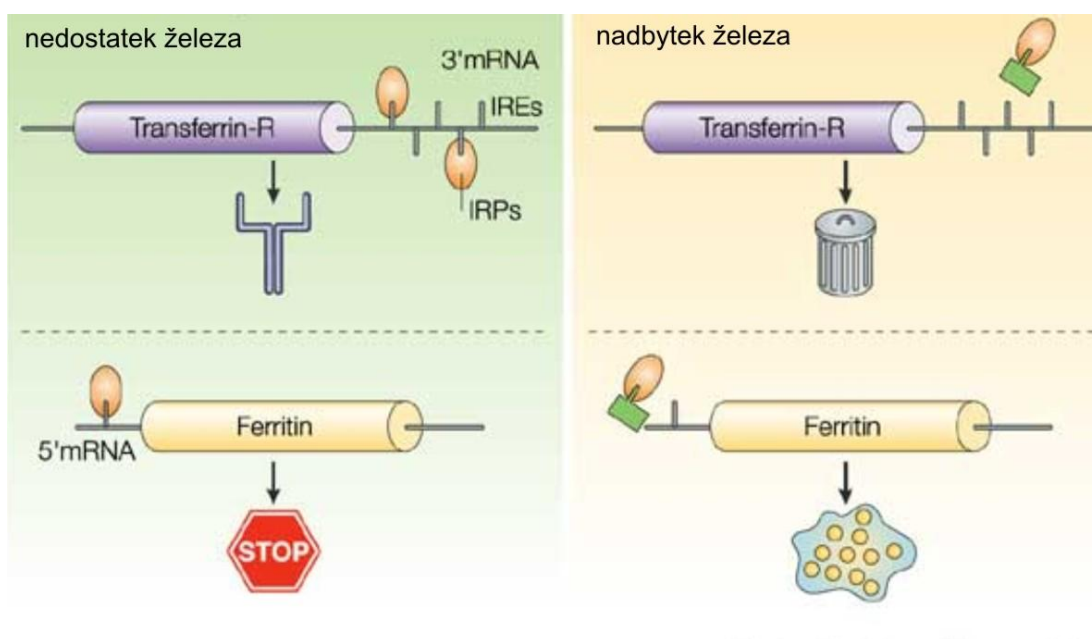
Na buněčné úrovni se regulace metabolismu železa posttranskripčně účastní systém IRPs-IREs (Iron responsive proteins – iron responsive elements). IREs jsou vlásenkovité struktury na obou koncích netranslatovaných úseků (UTR – untranslated region) mRNA, které kódují vlastní, železem regulovaný protein. IRPs jsou proteiny, které se na IREs vážou v případě, že je v organismu nedostatek železa. Jejich vzájemná vazba pak ovlivňuje aktivitu vlastního kódujícího úseku mRNA, čímž se ovlivní tvorba proteinů uplatňujících se v metabolismu železa, a to hlavně na úrovni translace – zvýšením stability mRNA (vazba na 3'konec) nebo změnou transkripce (vazba na 5'konec) Prozatím byly identifikovány dva typy IRP: IRP1 a IRP2. IRP1 se svou sekvencí podobá mitochondriální akonitase, také podobně jako akonitasa tvoří clustery a má enzymatickou aktivitu.

Ve stavu nedostatku železa v buňce se IRP1 vážou na IREs pro H- a L-řetězce ferritinu, δ -aminolevulátsynthasu, mitochondriální akonitasu a ferroportin a zablokují tak translaci těchto proteinů. Nedojde tedy k syntéze ferritinu (protože není železo, které by bylo třeba skladovat), δ -aminolevulátsynthasy (klíčového enzymu syntézy porfyrinů) a ferroportinu (tím se zablokuje export železa z buňky a to se uvnitř buňky zadrží a nelze ho transportovat). Ve stavu přebytku železa v buňce brání cluster IRP1 interakci s IRE pro transferrin, čímž dojde k destabilizaci této mRNA a snížené expresi transferrinu.

IRP2 se vážou na transferrinový receptor TfR1 a pro DMT-1. Při nadbytku intracelulárního železa jsou IRP2 oxidovány a degradovány v proteasomech. Při nízkých intracelulárních hladinách železa IRP2 stabilizují příslušnou mRNA, čímž posílí expresi proteinů důležitých pro přísun dalšího železa (volného i vázaného), tedy transferrinového receptoru TfR1 a DMT-1.

Expresce IRPs je také kontrolována jinými faktory, mezi které patří např. kyslíkové radikály, oxid dusnatý a hypoxie.

Schéma regulace metabolismu železa na buněčné úrovni je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5: Schéma regulace metabolismu železa na buněčné úrovni [20]

2.1.6.2 Systémová regulace metabolismu železa

Dlouhou dobu se předpokládalo, že v organismu existuje nějaký faktor, který hraje roli v systémové regulaci železa. V roce 2000 proběhly dvě na sobě nezávislé studie. V první studii byl izolován peptid z ultrafiltrátu lidské plazmy a byl pojmenován LEAP-1 (liver expressed antimicrobial peptide) [21]. Během druhé studie antimikrobiálních vlastností různých tělních tekutin byl izolován úplně nový peptid z lidské moči. Byl pojmenován hepcidin (na základě místa jeho syntézy v játrech hep- a antibakteriálních vlastností *in vitro* -cidin) [22]. Posléze se ukázalo, že právě hepcidin (Obr. 6) je ten dlouho hledaný faktor, který má klíčovou úlohu v regulaci metabolismu železa na systémové úrovni.

2.2 Hecpidin

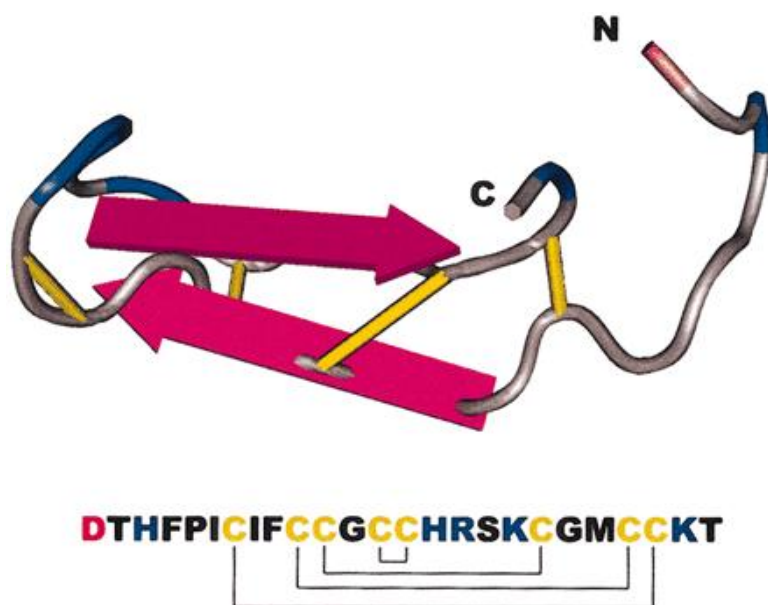
Prekursorový protein pro hepcidin se nazývá preprohepcidin. Ten je složený z 84 aminokyselin. Enzymatickým štěpením vzniká produkt prohepcidin složený z 64 aminokyselin, který je exportován z cytoplasmy do lumen endoplazmatického retikula. Tam je štěpen pomocí enzymu furin-like proprotein convertasa za vzniku bioaktivní formy hepcidinu o 25 aminokyselinách, které jsou propojené čtyřmi disulfidickými můstky [21, 22]. Molekula hepcidinu má tvar vlásenky. 25-aminokyselinová forma je v organismu dominantní. Byly však nalezeny i formy o 22 a 20 aminokyselinách. Ty vznikají odštěpením aminokyselin z řetězce hepcidinu-25 [22]. Hecpidin-25 a hepcidin-20 se podařilo detekovat jak v séru, tak v moči, zatímco hepcidin-22 byl nalezen pouze v moči [23], což naznačuje, že by mohlo jít o degradační produkt hepcidinu-25 [24]. Zdá se, že biologicky aktivní je pouze hepcidin-25, což by mohlo ukazovat na to, že oněch 5 aminokyselin, které hepcidin-20 postrádá, je pro biologickou aktivitu hepcidinu-25 zásadní [25,26]. Hecpidin-25 má jak antibakteriální, tak antifungální vlastnosti. Radiální difuze prokázala, že hepcidin s různou účinností inhibuje růst mikroorganismů, z gram pozitivních bakterií např. *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a streptokoky typu B, z gram negativních bakterií např. *Neisseria cinerea* či *Escherichia coli* a z plísní a kvasinek např. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus niger* [21,22]. To ho řadí do skupiny kationických antimikrobiálních peptidů bohatých na cystein, která zahrnuje i defensiny (struktura hepcidinu a místo jeho syntézy připomíná drosomycin, což je peptid se čtyřmi disulfidickými vazbami produkovaný tukovým tělískem drosophily (tukové tělísko je ekvivalent jater)), které mají svou úlohu v obraně organismu před infekcí [22].

Lidský hepcidin je kódován na úseku mRNA o velikosti 0,4 kilobází, který je tvořený třemi exony z 2,5 kb genu na chromosomu 19q13.1. Gen, který kóduje lidský hepcidin, se nazývá *HAMP*. Rozvoj různých poruch v metabolismu železa (nadbytek železa v organismu) po knock-outu genu u myši naznačil, že se hepcidin účastní regulace metabolismu železa. Zvířecí modely pro nadbytek železa v organismu zahrnují myši deficientní v oblasti Upstream faktoru 2 (*Uf2*), který neexprimuje hepcidin [27]. Nadprodukce hepcidinu u *HAMP*-transgenních myši vedla k rozvoji sideropenické anémie [28]. Tyto poznatky naznačily, že by *HAMP* mohl být kandidát pro spojení s juvenilní hereditární hemochromatósou.

Hecpidin v organismu funguje jako systémový regulátor železa, protože má charakter hormonu. Kontroluje transport železa z buněk ve tkáních, které jsou na železo bohaté, do

plazmy [29]. Inhibuje absorpci ve střevě [22,30], uvolňování železa z makrofágů [31] a průchod placentou [30]. Hepatocyty vyhodnocují stav železa v organismu a podle toho buď uvolňují, nebo naopak přestávají hepcidin syntetizovat. Hladina mRNA pro hepcidin kopíruje hladinu železa v organismu – při vzestupu koncentrace železa stoupá i produkce hepcidinu a naopak [32].

Hepcidin inhibuje export železa z buňky tím, že se váže na molekulu ferroportinu a indukuje tak jeho internalizaci a degradaci, a to především v makrofázích a v menší míře také v enterocytech [33].



Obr. 6: Struktura hepcidinu [3]

Mutace ferroportinu je spojená s akumulací železa především v makrofázích, často je přítomná též anémie [34]. Ačkoliv je hepcidin syntetizován převážně játry, byla jeho syntéza prokázána též v makrofázích [35], kardiomyocytech [36] a tukových buňkách [37], navíc hepcidin umí i inhibovat proliferaci progenitorů červených krvinek a jejich přežívání [38], což naznačuje, že se hepcidin účastní regulace metabolismu železa i jinými mechanismy než jen vazbou na ferroportin.

Již dlouho se ví, že železo potřebují pro svůj růst bakterie (pro tvorbu superoxiddismutasy, která je chrání před kyslíkovými radikály hostitele, a pro tvorbu železo-dependentní ribonukleotidreduktasy potřebné pro syntézu DNA) a že při vzrůstu koncentrace železa v organismu dochází ke snížení jeho obranyschopnosti [39]. Bakterie si umí poradit i v prostředí, kde je jen velmi nízká koncentrace železa vyvíjením nejrůznějších mechanismů pro jeho příjem. Hostitelský organismus však umí bakteriím železo odepřít, např. zvýšením syntézy vazebných proteinů, snížením absorpce železa, zvýšením produkce „vychytávačů“ hemoglobinu a heminu (haptoglobin, resp. hemopexin)

v játrech a uvolněním apolaktoferrinu z neutrofilů – apolaktoferrin zajistí vazbu železa na místech bakteriálního růstu. Podmínky, za kterých vzniká v organismu nadbytek železa, však tyto mechanismy hostitelského organismu limitují, proto je pak k infekci náchylnější [40]. Navíc nadbytek železa hraje velkou roli i v poškození imunitního systému hostitele – ovlivňuje funkci T-buněk tak, že buněčná imunitní odpověď je snížena [41]. Železo má také přímý inhibiční efekt na dráhy zprostředkované interferonem γ v makrofágu, tvorbu oxidu dusnatého (inhibicí NO-synthasy), tvorbu TNF- α (tumor necrosis factor α), expresi hlavního histokompatibilního komplexu třídy II a expresi ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1) [41]. Identifikace molekuly NRAMP-1 (natural resistance-associated macrophage protein 1), která je zapojená do regulace metabolismu železa v makrofágu a hraje velmi důležitou roli v počáteční fázi aktivace makrofágů, vysvětlila úzký vztah mezi imunitní odpovědí a železem [42]. Koncentrace hepcidinu v moči také výrazně stoupá při rozvoji systémové infekce v organismu [3].

Molekula hepcidinu obsahuje také kladně nabitě úseky, které se vážou na negativně nabitě fosfolipidové povrchy membrán nejrůznějších mikrobů. Spekuluje se také o tom, že hepcidin dokáže následně po navázání narušit funkci membrány, penetrovat a zničit tak buňky nebo zvýšit imunitní odpověď buňky díky svým chemotaktickým vlastnostem [21].

2.2.1 Regulace syntézy hepcidinu

2.2.1.1 Aktivátory syntézy hepcidinu

Signální cesta BMP6-HJV-SMAD

Proteiny BMP (bone morphogenetic proteins) patří do superrodiny signálních molekul TGF- β (transforming growth factor β). Na buněčném povrchu jsou receptory typu I a II pro serin threonin kinasu, na které se vážou BMP ligandy. Po vytvoření tohoto komplexu dojde k fosforylaci receptoru typu II receptorem typu I a receptor typu II poté fosforyluje intracelulární proteiny SMAD1, SMAD5 a SMAD8. Tyto SMAD proteiny vytvoří komplex s mediátorem SMAD4 a tento komplex pak putuje do jádra, kde moduluje transkripci genu pro hepcidin [43]. Hemojuvelin (HJV) působí jako koreceptor, když se selektivně váže na BMP a zesiluje tak signál SMAD proteinů. Mutace v genu pro HJV způsobuje hromadění železa v organismu v důsledku toho, že tato cesta přestává fungovat jako aktivátor syntézy hepcidinu, čímž přestane být regulována funkce ferroportinu [44].

2.2.1.2 Regulace syntézy hepcidinu železem

Železo stimuluje expresi hepcidinu, čímž vlastně vzniká jakási zpětná vazba k udržení tzv. steady state. Mechanismus působení železa na expresi hepcidinu spočívá v aktivaci BMP6-HJV-SMAD signální cesty, jak ale přesně vypadá, není dosud známo [44].

2.2.1.3 Regulace syntézy hepcidinu zánětem

Zánětlivý stav je silný induktor syntézy hepcidinu [30]. Nejlépe charakterizovaný mechanismus je přímá aktivace transkripce hepcidinu v játrech prostřednictvím IL-6, který se váže na své receptory, obsahující protein gp130, čímž se aktivují janus kinasa (JAK) a aktivátor transkripce 3 (STAT3), který se pak váže do promotoru v úseku DNA, která kóduje hepcidin [45, 46]. V indukci hepcidinu mohou hrát roli i jiné prozánětlivé cytokiny, např. IL-1 [47]. Navíc se zdá, že indukce hepcidinu interleukinem 6 vyžaduje neporušenou signální cestu BMP-SMAD, protože jakékoliv narušení buď v mediátoru SMAD4, nebo v HJV tuto indukci naruší [44].

Nedávno byl popsán další mechanismus, kterým dojde k indukci hepcidinu při zánětlivém stavu. Prozánětlivé cytokiny a bakteriální lipopolysacharid mohou společně indukovat expresi hepcidinu tím, že aktivují endoplazmatické retikulum a zároveň se zvýší tvorba proteinu CREBH (cyclic AMP response element-binding protein H), který aktivuje transkripci genů pro proteiny akutní fáze v játrech. Tak dojde i ke zvýšené expresi hepcidinu.

Hepcidin je také produkován v makrofázích. Je zde indukován buď pomocí lipopolysacharidu, nebo určitých bakteriálních struktur, a to prostřednictvím Toll-like receptorů a asi i IL-6/STAT3 cesty. Na rozdíl od jater není hepcidin v makrofázích indukován železem. Produkce hepcidinu v makrofázích způsobí to, že dojde k poklesu exprese ferroportinu, čímž buňka nemůže exportovat železo, které tak zůstane nedostupné pro bakterie [44].

2.2.1.4 Inhibitory syntézy hepcidinu

Solubilní hemojuvelin

Hemojuvelin (HJV) je za normálních okolností zanořen do buněčné membrány pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy. V lidské krvi však byla detekována i rozpustná forma tohoto proteinu. Zdá se, že hemojuvelin uvolňuje z membrány konvertasa furin či transmembránová serinová proteasa 6 (TMPRSS6). Předpokládá se, že v membráně zakotvený HJV působí jako koreceptor k zesílení BMP-SMAD signální cesty a tím i exprese hepcidinu, kdežto solubilní HJV tuto cestu naopak inhibuje, protože zmizí posilující efekt pro BMP-SMAD signální cestu. HJV není exprimován jen v játrech, ale i v tkáních skeletu a srdce, kde je jeho funkce ale zatím neznámá [44].

2.2.1.5 Regulace hepcidinu anémií

Anémie a erythropoetin jsou poměrně silné inhibitory exprese hepcidinu. Tím, že se sníží exprese hepcidinu, dojde k uvolnění železa z buněk a to tak může být využito pro

erythropoesu [30]. Inhibiční efekt anémie a erythropoetinu je silnější než stimulace syntézy hepcidinu železem, což je obzvláště patrné hlavně u β -thalasémie, kde zůstává hladina hepcidinu nízká i přes vysokou hladinu železa v organismu.

2.2.1.6 Regulace hepcidinu hypoxií

Také hypoxie je silný inhibitor exprese hepcidinu, a to dokonce i když není přítomná anémie [30]. Přesný mechanismus není dosud plně popsán, ale zdá se, že v něm hraje roli HIF (hypoxia inducing factor) cesta, která je také zprostředkovatelem pro expresi erythropoetinu a jiných genů závislých na hypoxii.

HIF jsou heterodimerické transkripční faktory, které se skládají z regulační podjednotky α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) a podjednotky β (HIF-1 β , také známý jako ARNT). Za normálních podmínek (normoxie, dostatek železa) je podjednotka HIF- α hydroxylována prostřednictvím železo-dependentní 2-oxoglutarát-dependentní oxygenasy a poté degradována. Za hypoxických podmínek a při nedostatku železa se podjednotka HIF- α hromadí, translokuje do jádra, dimeruje s podjednotkou β a váže se do specifických hypoxie-responsivních elementů (HREs), kde cíleně moduluje transkripci genů [48].

2.2.1.7 Regulace hepcidinu deficitem železa

Také deficit železa inhibuje expresi hepcidinu. Zde se zřejmě také uplatňuje HIF cesta – jedním mechanismem této inhibice může být to, že 2-oxoglutarát dependentní dioxygenasa, která oxygenuje HIF- α podjednotky, je závislá na železu i na kyslíku, které při deficitu železa a hypoxii chybí [48,49]. Dalším důležitým faktorem v inhibici hepcidinu nedostatkem železa je i působení TMPRSS6 – mutace v tomto enzymu u lidí a myši vedly k refrakterní anémii (IRIDA – iron-refractory iron deficiency anemia), která neodpovídá na léčbu orálně podávaným železem a jen velmi omezeně odpovídá na parenterální léčbu železem. Pacienti a myši s touto mutací však měli vysoké hladiny hepcidinu, které zřejmě způsobovaly anémii, což vede k závěrům, že nemutovaná forma TMPRSS6 normálně funguje jako supresor hepcidinu v případě nedostatku železa – přesný mechanismus však ještě nebyl popsán [44].

2.2.2 Role hepcidinu v anémiích

Anémie je často spojená s různými chronickými infekcemi, zánětlivými chorobami a zhoubnými procesy. Taková anémie je obvykle normocytární normochromní, časem ale může přejít v mikrocytární a hypochromní. Hecpidin je klíčový faktor pro vznik takové anémie. Anémie vzniklé na podkladu zvýšené koncentrace hepcidinu v organismu získaly různý název – anémie chronických chorob (anemia of chronic disease, ACD), anémie

způsobená zánětem (anemia of inflammation, AI) a anémie způsobená malignitou (anemia of malignancy).

2.2.2.1 Anémie chronických chorob (ACD)

Působení zánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α a IFN γ) a narušená erythropoesa vedou ke vzniku tzv. anémie chronických chorob [50]. K jejímu vzniku vedou zřejmě i neinfekční, avšak chronické choroby. Hecpidin v této anémii hraje důležitou roli: brání vstřebávání železa ve střevě a uvolnění železa z makrofágů [51]. ACD je charakterizována jako normochromní a mírně mikrocytární s nízkou koncentrací železa a nízkou saturací transferrinu a zvýšenými zásobami železa v kostní dřeni a zvýšeným sérovým ferritinem. V laboratorním nálezu je dále nízký počet retikulocytů svědčící pro nízkou erythropoesu a normální či mírně snížená koncentrace transferrinu a mírně zvýšená hladina solubilních transferrinových receptorů [50].

2.2.2.2 Anémie způsobená zánětem (AI)

S touto anémií se lze setkat u kriticky nemocných pacientů. Je charakterizována anémií, vysokými hladinami ferritinu a vysokými zásobami železa v organismu. Zánět stimuluje hepatocyty, které začnou exprimovat hepcidin ve větší míře. Ten se pak naváže na ferroportin a způsobí jeho internalizaci a degradaci. Tím dojde k zastavení vstřebávání železa enterocyty a k uvěznění železa uvnitř makrofágů, čímž se zastaví i recyklace železa [41].

2.2.2.3 Anémie způsobená nádorem

Anémie je běžně přítomná u pacientů s nejrůznějšími zhoubnými onemocněními, často např. u Hodgkinova lymfomu, nádoru plic či prsu. Jde vlastně o AI, jen je její příčinou např. infiltrace kostní dřene nádorovými buňkami, chemoterapie či radioterapie, zničení erythroidních progenitorových buněk volnými radikály či produkce prozánětlivých cytokinů [50]. Nadprodukce hepcidinu opět vyvolá snížení absorpce železa v enterocytech i uzavření železa uvnitř makrofágů. Dokonce lze předpokládat, že některé nádory jater mohou ektopicky produkovat hepcidin, neboť se při resekcí takového nádoru anémie vyřešila [52].

2.2.3 Choroby spojené s pozměněnou expresí hepcidinu

Existují další choroby, u kterých je přítomna anémie a hepcidin hraje klíčovou roli v jejich patogenezi. Mezi nejběžnější choroby patří hemochromatosa, thalasémie, zánětlivá nemoc střev, chronická nemoc ledvin, revmatoidní artritida a aterosklerosa.

2.2.3.1 Hemochromatosa

Hemochromatosa (či hereditární hemochromatosa, HH) je v bělošské populaci celkem časté onemocnění. Asi 10 % obyvatel v této populaci je nosičem a asi jeden obyvatel z 300 je homozygot pro HH. Ta se projevuje vstřebáváním železa z potravy i za podmínek dostatečné saturace organismu. Toto železo pak nemůže být nijak vyloučeno a ukládá se v různých tkáních a orgánech. Přetížení organismu železem může vést k dysfunkci a selhání těchto orgánů, a to zejména srdce, jater či pankreatu. Tato choroba se také nazývá „bronzový diabetes“ pro charakteristické zbarvení kůže jedinců s HH.

Nejčastěji se objevující mutace je v genu *HFE*. HFE protein (hemochromatosis protein) je atypický protein MHC I lokalizovaný na chromosomu 6 [41]. HFE je také zapojený do udržování homeostasy železa v organismu – kontroluje a moduluje tvorbu hepcidinu, ale jeho přesná role ještě není odhalena. Zatím byly identifikovány 4 hlavní typy hereditární hemochromatosis a u všech je mutace v nějakém genu, který ovlivňuje tvorbu hepcidinu či jeho interakci s ferroportinem. Např. hlavní mutace C282Y způsobuje změnu v konformaci proteinu HFE [53].

Hemochromatosa může být také způsobena i jinými vlivy – pak jde o tzv. sekundární hemochromatosis, která je způsobena nadměrným příjmem železa do organismu např. při různých chronických hemolýzách, včetně intravaskulární, inefektivní erythropoese (hemolýza v kostní dřeni), častých opakovaných krevních transfuzích, při nadměrném užívání potravy či potravních doplňků obsahujících železo či při přítomnosti predispozičních faktorů, např. u cirhosis, steatohepatitidy, porfyrie, atd.

2.2.3.2 Thalasémie

Thalasémie je hlavní příčinou hromadění železa v organismu především u obyvatel Středomořské oblasti. Příčinou thalasémie je mutace v genech kódujících syntézu globinového řetězce hemoglobinu. Rozlišuje se tak α -thalasémie a β -thalasémie. Jejím projevem je různě těžká hemolytická anémie a také hromadění železa v organismu, které je ale způsobené především opakovanými transfúzemi, které léčba této choroby vyžaduje, zdá se však, že je zároveň zvýšená i absorpce železa. Nedostatek hepcidinu umožňuje železu ukládat se v různých tkáních a orgánech, a tak často dochází k poškozením srdeční tkáně a endokrinopatiím [41].

2.2.3.3 Zánětlivé onemocnění střeva (Inflammatory bowel disease, IBD)

Mezi tyto choroby patří např. Crohnova choroba či celiakie. Jsou charakterizovány souhrou mezi zánětlivým a cytotoxickým mechanismem. Zvláště cytokin IL-6 má zásadní roli v patogenezi těchto chorob. Navíc indukuje syntézu hepcidinu [54]. Hepcidin však

patří mezi defensiny, jejichž nedostatek je pro takové onemocnění charakteristický [55]. Studie, ve kterých se stanovovala hladina hepcidinu, však prozatím nepřinesly jednoznačné výsledky. V jedné studii byla hladina hepcidinu u pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerósní kolitidou signifikantně nižší než u kontrolní skupiny [56], v jiných studiích byla u obdobné skupiny pacientů nalezena vyšší hladina prohepcidinu ve srovnání s kontrolní skupinou [57]. Stanovení hladiny prohepcidinu je však diskutabilní, neboť se zdá, že nemá přímý vztah k hepcidinu [58,59].

2.2.3.4 Chronická nemoc ledvin (Chronic kidney disease, CKD)

Nález anémie u pacientů s chronickým onemocněním ledvin je poměrně častý jev. Její patogeneze je multifaktoriální a hlavním činitelem je zřejmě nedostatečná produkce erythropoetinu v důsledku onemocnění a zánětu. Zánět zároveň způsobuje rezistenci organismu na terapii erythropoetinem. Zároveň se v organismu kumulují uremické toxiny, které mají antiproliferativní účinky. Chronická aktivace imunitního systému kvůli trvalé infekci a kontaktu buněk s dialyzační membránou vede ke změně v regulaci homeostasy železa v organismu a vyvine se anémie chronických chorob. Produkce hepcidinu je ovlivněna stavem železa v organismu, anémií a hypoxií. Hladiny hepcidinu-25 v séru hemodialyzovaných pacientů byly nalezeny signifikantně vyšší oproti hladinám u kontrolních osob, zvýšení hladiny hepcidinu nejspíše způsobuje i retence tohoto peptidu při poklesu glomerulární filtrace na velmi nízké hodnoty. Metody pro stanovení hepcidinu by mohly sloužit pro predikci a monitorování odpovědi organismu na terapii intravenosním železem a erythropoetinem [60].

Dalším faktorem, který vede k anémii, jsou ztráty krve při napojování na umělou ledvinu a také zkrácené přežívání erythrocytů následkem poškození jejich membrány při chronickém zánětu a oxidačním stresu [61].

2.2.3.5 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé onemocnění kloubů, které se projevuje i systémově. Anémie je u této choroby poměrně častá. V synoviální tekutině postižených kloubů je hojně syntetizován IL-6, který indukuje hepatocyty, což vede ke zvýšené syntéze hepcidinu a vzniku anémie [62].

2.2.3.6 Atherosklerosa

Existují studie, které považují trvalý mírný nedostatek železa v organismu za protektivní u ischemické srdeční choroby [63]. Protože už je známo, jak hepcidin ovlivňuje uvolňování železa z makrofágů, lze také předpokládat, že deplece železa bude mít svůj protektivní vliv i proti tvorbě aterosklerotických plátů. Hromadění železa v makrofázích

může způsobit vyšší pohlcování lipidů prostřednictvím stimulace exprese scavengerových receptorů 1 v makrofágu a jejich lipoperoxidaci a tvorbu pěnové buňky [64]. Zablokování tohoto hromadění a ukládání železa v makrofázích plaků může inhibovat tvorbu léze a progresi aterosklerotického plátu [65].

2.2.4 Stanovení hepcidinu

Stanovení hepcidinu není úplně jednoduché. Jde o velmi malou molekulu, která je mezidruhově velmi konzervativní, proto je příprava protilátky obtížná. Nejprve byly vyvinuty metody ke stanovení prohepcidinu v séru. Zdá se však, že hladiny prohepcidinu nekorespondují s hladinami hepcidinu [66, 67]. Poté bylo vyvinuto několik technik ke stanovení hepcidinu, a to jak v séru, tak v moči. Nejprve byla vyvinuta technika semikvantitativního imunodotu, založená na extrakci hepcidinu iontoměničovou chromatografií s následnou chemiluminiscenční kvantifikací pomocí králičí protilátky [54]. Poté byly vyvinuty techniky hmotnostní spektrometrie SELDI-TOF/MS (surface-enhanced laser desorption/ionization–time-of-flight/mass spectrometry), výsledky z těchto metod však byly kvůli chybějícímu internímu standardu hodnoceny pouze semikvantitativně [68].

První kvantitativní metoda byla vyvinuta v roce 2007 [69], interní standard ale nebyl ideální, protože se příliš lišil od hepcidinu. V roce 2008 byla vyvinuta první kompetitivní ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) metoda, protože se podařilo získat dostatečné množství specifické protilátky proti hepcidinu [70]. Jako další byly vyvinuty radioimunoanalytické metody [71] a také sendvičová ELISA metoda [72]. Z komerčních souprav byla dostupná ELISA souprava firmy Bachem a od roku 2009 ELISA souprava firmy DRG. Novější stanovení pomocí hmotnostní spektrometrie už používají lepší interní standard, nejčastěji izotopově značený hepcidin či syntetický hepcidin-24 [73, 74].

2.2.5 Možné léčebné strategie

Anémie chronických chorob (anemia of chronic disease – ACD) se často objevuje u pacientů s chronickými infekcemi, autoimunitními chorobami, nádorovým onemocněním či chronickým selháním ledvin a je spojena s horší prognózou a zhoršenou kvalitou života těchto pacientů. Obvyklá léčba pomocí aplikace intravenózního železa a erythropoetin-stimulujících léků (ESA) u některých pacientů nepřináší uspokojivý výsledek, nehledě na to, že není zcela bez vedlejších účinků. Pro tyto pacienty je třeba vyvinout nové léčebné strategie, z nichž některé cílí na osu hepcidin-ferroportin. Snížením produkce hepcidinu a zvýšením aktivity ferroportinu by mělo dojít ke zvýšení dostupnosti železa jak díky vyšší absorpci v enterocyty, tak díky mobilizaci železa z makrofágů, a to bez vedlejších účinků intravenózně dodávaného železa či terapie erythropoetinem. V současné době se zkoumá několik strategií, jak na osu hepcidin-ferroportin zacílit.

2.2.5.1 Inhibice funkce hepcidinu přímým antagonistou

Protilátky proti hepcidinu

Studie působení monoklonálních protilátek proti hepcidinu či ferroportinu se zabývají např. firmy Amgen či Eli Lilly. Studie provedená firmou Amgen ukázala, že monoklonální protilátka proti hepcidinu (mAb2.7) v kombinaci s terapií s látkami podporujícími účinek erythropoetinu (erythropoiesis-stimulating agents, ESA) zablokovala funkci hepcidinu, což vedlo ke zlepšení dostupnosti železa v organismu a k zastavení rozvoje chronické anémie. Fungovala však pouze v kombinaci s ESA [75].

Společnost Eli Lilly má na léčbu anémie pomocí monoklonální protilátky proti hepcidinu patent (US Patent #7820163) a v současné době jsou podle webových stránek společnosti jak protilátky proti hepcidinu, tak proti ferroportinu v I. fázi klinického výzkumu [76].

2.2.5.2 RNA interference a antisense oligonukleotidy proti hepcidinu

RNA interference (RNAi) a „umlčování“ genů pomocí antisense oligonukleotidů cílené na transkripci a translaci hepcidinu představují další strategii pro rozvoj nových léčiv chronické anémie.

Firma Amgen představila strategii, kdy u myšního modelu RNA ve tvaru krátké vlásenky (short hairpin RNA, shRNA) proti hepcidinu redukovala jeho expresi a vedla ke zlepšení anémie. Silná suprese hepcidinu stačila k tomu, aby se železo ze zásob mobilizovalo, u mírné suprese byla ke zlepšení anémie zapotřebí ještě podpora ESA [75].

2.2.5.3 Proteiny vážící hepcidin

Mezi tyto proteiny se řadí tzv. lipokaliny. To jsou secernované proteiny, v jejichž struktuře je smyčka tvořící kapsu, ve které je ukryto vazebné místo, kam se mohou vázat malé hydrofobní ligandy a různé povrchové receptory. Pro tyto jejich vlastnosti se studují jako nadějně terapeutické proteiny, které by mohly mít specifické blokační vlastnosti, pro které se nazývají antikaliny [77].

2.2.5.4 Spiegelmery vážící hepcidin

Nová třída jednovláknových oligonukleotidových struktur s blokačními vlastnostmi jsou tzv. aptamery vážící ligandy s vysokou afinitou. Firma NOXXON Pharma vlastní obchodní značku na tzv. spiegelmery, což jsou zrcadlově obrácené aptamery (z německého der Spiegel – zrcadlo). Jde opět o atraktivní možná terapeutika, protože jsou vysoce rezistentní k nukleasové aktivitě, jsou stabilní *in vivo* a vykazují velmi nízkou imunogenicitu [78].

2.2.5.5 Inhibitory produkce hepcidinu

Cílená inhibice pozitivních regulátorů exprese hepcidinu může být účinnější než přímá blokáce účinku hepcidinu. Za tímto účelem byly studovány inhibitory dvou signálních drah: BMP6-HJV-SMAD a IL-6-STAT3.

Inhibitory BMP6-HJV-SMAD cesty

Dorsomorfin

Dorsomorfin je malá molekula, která byla objevena v embryích zebřiček (*Danio rerio*). Ukázalo se, že v kultuře hepatocytů inhibuje expresi hepcidinu stimulovanou jak BMP, tak i HJV a IL-6. Derivát dorsomorphinu LDN-193189 měl jako inhibitor BMP ještě vyšší sílu a selektivitu a inhiboval aktivitu BMP *in vivo* [79].

Rozpustná forma hemojuvelinu

Ukázalo se, že rozpustná forma lidského hemojuvelinu vázaná na konstantní oblast IgG1 (HJV.Fc) snížila expresi hepcidinu indukovanou BMP *in vitro* a u zdravých potkanů navíc blokovala SMAD aktivaci, mobilizovala železo ze zásob a zvýšila hladinu železa v krvi. I zde dochází k výzkumu v součinnosti s farmaceutickou firmou, doposud však nebyly ověřeny účinky této protilátky na lidský organismus [80].

Monoklonální protilátka proti BMP6

Další možností, jak specificky zablokovat regulaci hepcidinu pomocí BMP6, je terapie anti-BMP6 monoklonální protilátkou. Zde bude však třeba vyvinout protilátku, která by byla zaměřená právě jen proti BMP6, aniž by se vážala na ostatní BMP proteiny. Také účinky na lidský organismus nejsou doposud známé [81].

Heparin

Další látkou, u které byl zjištěn účinek snížení exprese hepcidinu, je heparin, který je běžně používaný jako antikoagulační činidlo. Působením heparinu na hepatocyty *in vitro* došlo ke snížení transkripce hepcidinu a injekce heparinu u zdravých myší vedla také ke snížené expresi hepcidinu s následným zvýšením hladiny železa v krvi a k mobilizaci zásob železa z makrofágů. Navíc u pacientů s hlubokou žilní trombosou léčených heparinem byla po zahájení léčby nalezena nižší hladina hepcidinu a vyšší hladina železa než před léčbou [82]. Jestli se však heparin stane terapeutikem i v léčbě anémie, zůstává otázkou, protože jsou známy vedlejší účinky této léčby, mezi které patří život ohrožující krvácení, heparinem indukovaná trombocytopenie, hyperkalémie, alopecie a osteoporosa.

Alkohol

Bylo zjištěno, že u myší vyvolal alkohol snížení exprese hepcidinu a zvýšení intestinální absorpce železa [83]. Chronická konzumace alkoholu u lidí je spojena

s akumulací nadbytku železa v játrech a hepcidin může být jedním z faktorů, které se podílejí na vzniku alkoholické jaterní nemoci [84]. Terapeutický potenciál alkoholu v léčbě chronické anémie je zajímavý, musí se však brát v potaz i velmi dobře známé nežádoucí účinky alkoholu na lidský organismus.

Inhibitory IL-6 cesty

Ukázalo se, že inhibitory dráhy interleukinu-6 pomohly snížit expresi hepcidinu a zlepšit anémii u multicentrické Castlemanovy choroby, což je lymfoproliferativní onemocnění, které se vyznačuje zvýšenou produkcí IL-6 v lymfatických uzlinách a je asociováno s hypochromní a mikrocytární anémií. U pacientů s touto chorobou byly vyšší také hladiny hepcidinu, pravděpodobně z důvodu zvýšené produkce IL-6. U většiny pacientů, kteří byli léčeni protilátkou proti IL-6 tocilizumabem, došlo během 6-12 měsíců k poklesu hladiny hepcidinu, normalizaci hladiny hemoglobinu a také ke zlepšení celkového stavu v důsledku snížené únavnosti, zvýšení hmotnosti a redukce horečnatých stavů [85].

2.2.5.6 Vitamín D

Vitamín D je hormon, jehož syntéza probíhá v kůži po UV ozáření a k aktivaci dochází v játrech a ledvinách. Primárně v organismu reguluje metabolismus vápníku a fosforu, má ale i další využití, např. hraje roli v diferenciaci hematopoetických buněk či down-regulaci transkripce prozánětlivých cytokinů. Deficit vitamínu D je asociován se zvýšenou prevalencí anémie chronických chorob u starších osob [86] a často se objevuje u pacientů s chronickým selháním ledvin a u hemodialyzovaných pacientů [87]. Nedávná pilotní studie ukázala, že suplementace vitamínem D u hemodialyzovaných pacientů s jeho nedostatkem vedla ke snížení potřebné dávky erythropoetinu, což bylo v souladu s jinou studií provedenou u nedialyzovaných pacientů s chronickým renálním selháním, kdy přísun vitamínu D koreloval se snižující se potřebnou dávkou erythropoetinu [88, 89].

2.2.5.7 Agonisté a stabilizátory ferroportinu

Pro korekci anémie chronických chorob by mohly být využity i stabilizátory funkce ferroportinu na buněčném povrchu. Bylo zjištěno, že pro interakci hepcidinu s ferroportinem je zásadní thiol cysteinu³²⁶ v molekule ferroportinu [90]. Proto se hledá podobná struktura, která by zabránila vazbě hepcidinu na ferroportin a chránila tak ferroportin před internalizací. Mohly by to být např. srdeční glykosidy, které sice nebrání vazbě hepcidinu, ale zdá se, že brání internalizaci ferroportinu [91]. Dále by to mohla být např. protilátka proti ferroportinu vyvinutá firmou Eli Lilly, která se váže na extracelulární smyčku ferroportinu a brání tak interakci hepcidinu s ferroportinem, přičemž funkce ferroportinu zůstává zachována.

Tyto přístupy by měly vést k tomu, že zůstane zachována funkce ferroportinu, čímž by mělo docházet k přísunu železa do organismu (absorpce) a také k jeho recyklaci. To by mělo mít za následek zlepšení anémie z nedostatku železa způsobené nadbytkem hepcidinu. Bezpečnost a účinnost této terapie u lidí však dosud nebyla zkoumána.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Hypotézy a cíle

V roce 2000 byl objeven peptid složený z 25 aminokyselin s antimikrobiálními účinky nazvaný hepcidin. Později se ukázalo, že tento peptid funguje jako hormon a že jde o klíčový regulátor složitého metabolismu železa. Regulace tvorby tohoto peptidu probíhá jak na buněčné, tak na systémové úrovni, kde se uplatňuje především zánět, který tvorbu hepcidinu zvyšuje.

Anémie u pacientů s chronickým onemocněním ledvin se vyskytuje poměrně často. Příčiny jejího vzniku jsou různé, přičemž hlavní roli hraje zřejmě nedostatečná produkce erythropoetinu v důsledku onemocnění ledviny a zánět, který zároveň způsobuje rezistenci organismu na terapii erythropoetinem a také nadprodukcí hepcidinu, čímž dochází k tomu, že tito pacienti mají sice zásoby železa v organismu velké, nemohou je však dostatečně využít.

Na našem pracovišti jsme od roku 2008 do roku 2012 provedli celkem tři studie, které se zabývaly vztahem hepcidinu k parametrům metabolismu železa u pacientů z chronického hemodialyzačního programu nebo u pacientů, kterým byla provedena transplantace ledviny.

V pilotní studii Heparin u hemodialyzovaných pacientů bylo hlavním cílem především vyzkoušet postup stanovení hepcidinu a určit jeho vztah k parametrům metabolismu železa a k CRP jako k zánětlivému parametru.

V druhé studii Heparin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů bylo naším cílem popsat vzájemné vztahy hepcidinu, parametrů metabolismu železa, zánětu a erythropoese u většího souboru pacientů. Předpoklad byl ten, že pacienti, kteří budou mít vysoký ferritin, který je považován také za ukazatel zánětu v organismu, budou mít vlivem zánětu také vysoký hepcidin.

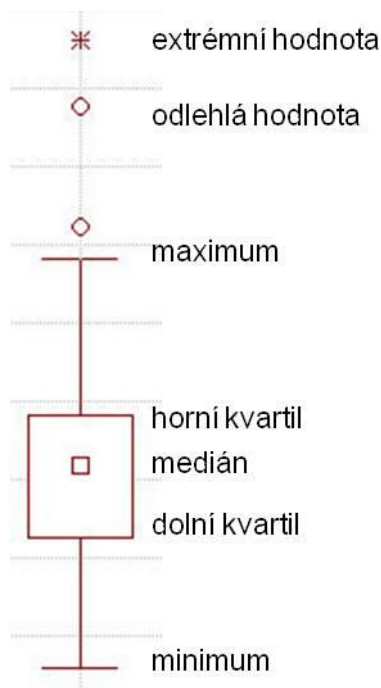
Ve třetí studii Heparin u pacientů po transplantaci ledviny bylo cílem popsat změny v metabolismu železa, které nastanou po transplantaci ledviny. Předpoklad byl ten, že u pacientů se po transplantaci obnoví vlastní tvorba erythropoetinu, čímž se podstatně zlepší tvorba erythrocytů, zároveň ustoupí zánět, který prostřednictvím hepcidinu blokuje železo uvnitř buněk, a železo se tak stane znovu využitelným. Tím, že ustoupí zánět, by zároveň měla poklesnout hladina hepcidinu.

Statistické analýzy byly provedeny v programech MS Excel (Microsoft®, Redmond, USA), MedCalc (Ostend, Belgie), SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) a Statistica (StatSoft Inc. Tulsa, USA). Byly použity následující testy: Mann-Whitneyův test, Kruskal-

Wallisův test, Friedmanova ANOVA, repeated ANOVA, Wilcoxonův test, neparametrická Spearmanova korelace, pořadová korelace a párový znaménkový test.

Statistickou analýzu třetí studie provedl ing. Stanislav Kormunda.

Krabicové grafy jsou vyjádřeny odspoda jako minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil, maximum a eventuálně odlehlé hodnoty a extrémní hodnoty, viz Obr. 7.



Obr. 7: Popis jednotlivých poloh v krabicovém grafu

Grafické vyjádření repeated (opakované) ANOVA není ve formě krabicových grafů, ale ve formě průměr \pm 95% konfidenční interval.

3.2 Pilotní studie Hepcidin u hemodialyzovaných pacientů

3.2.1 Pacienti

Do této studie bylo zařazeno 40 pacientů (22 mužů, 18 žen) z programu chronické dialýzy ve Fakultní nemocnici v Plzni. Byli ve věku 38-84 let (průměrný věk 69 ± 11 let). Pacienti byli zařazeni do chronického dialyzačního programu různě dlouho - v rozpětí 4-208 měsíců, průměrně 46 měsíců. Příčina chronického renálního selhání byla v 10 případech diabetická nefropatie, v 8 případech tubulární intersticiální nefropatie, v 5 případech nefrosklerosa, ve 3 případech polycystická choroba ledvin, v 11 případech byla příčina chronického renálního selhání jiná než výše zmiňované nebo byla jejich kombinací a ve třech případech byla příčina neodhalena. Pacienti nedostávali 14 dní před započítáním studie žádné železo i.v.

3.2.2 Kontroly

Protože šlo pouze o pilotní studii, nebyly provedeny žádné analýzy kontrolních osob. Studie byla schválena etickou komisí a pacienti podepsali informovaný souhlas.

3.2.3 Biochemická měření

Standardními metodami byly v laboratořích Ústavu klinické biochemie a hematologie na analyzátoru AU 2700 Beckman Coulter (Lismeehan, Irsko) změřeny parametry krevního obrazu, železo, ferritin, transferrin a CRP. Hepcidin v krevním séru byl stanoven pomocí komerčně dostupného ELISA setu (Bachem, Merseyside, Velká Británie). Nejprve byl ze séra extrahován pomocí afinitních kolonek a extrakt byl následně stanoven kompetitivní ELISA technikou s králičí protilátkou proti hepcidinu, která byla detekována biotinem značeným křenovou peroxidasou, na analyzátoru NexGen Four (Adaltis, Řím, Itálie). Solubilní transferrinové receptory (sTfR) byly změřeny imunoturbidimetricky pomocí setu TinaQuant® sTfR (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) na analyzátoru AU 400 Beckman Coulter.

3.2.4 Statistika

Statistická analýza byla provedena pomocí programu MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgie). Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (interkvartilové rozpětí). Korelace biochemických parametrů byla provedena pomocí neparametrické Spearmanovy korelace.

3.2.5 Výsledky

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 2: Statistická deskripce výsledků

Parametr	medián	interkvartilové rozpětí
železo (μmol/l)	10,9	7,1-12,4
ferritin (μg/l)	652	372-849
transferrin (g/l)	1,68	1,37-1,95
sTfR (mg/l)	1,27	0,88-1,43
CRP (mg/l)	12	2,5-14
hepcidin (μg/l)	141,9	29,6-202,1
saturace transferrinu	0,23	0,19-0,33

Neparametrickou korelací bylo zjištěno, že železo významně negativně korelovalo se sTfR a CRP, ferritin negativně koreloval s transferrinem, transferrin pozitivně koreloval se

sTfR a hepcidin významně pozitivně koreloval se železem a saturací železa a negativně s transferrinem se sTfR, jak je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 3: Výsledky neparametrické korelace parametrů metabolismu železa, CRP a hepcidinu

korelující parametry	korelační koeficient	p
železo se sTfR	r=-0,425	p=0,0063
železo s CRP	r=-0,476	p=0,0019
ferritin s transferrinem	r=-0,383	p=0,0147
transferrin se sTfR	r=0,33	p=0,0374
hepcidin se železem	r=0,339	p=0,0321
hepcidin s transferrinem	r=-0,399	p=0,0107
hepcidin se sTfR	r=-0,369	p=0,0192
hepcidin se saturací transferrinu	r=0,421	p=0,0076

3.3 Studie Hpcidin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů

3.3.1 Pacienti

Do této studie bylo zařazeno 178 pacientů z programů chronické dialýzy ve Fakultní nemocnici v Plzni a v dialyzačním středisku B. Braun Avitum v Plzni. 14 pacientů bylo z této studie následně vyřazeno z důvodu probíhající infekce (vyřazovací kritérium CRP>30 mg/l). Tím v souboru zbylo 164 pacientů, z toho 63 žen a 101 mužů ve věkovém rozmezí 25-92 let (průměrný věk 66±13 let). Pacienti byli zařazeni do chronického dialyzačního programu různou dobu-v rozpětí 1-240 měsíců, v průměru 39 měsíců. Příčina chronického renálního selhání byla v 71 případech diabetická nefropatie, ve 25 případech tubulární intersticiální nefropatie, v 18 případech glomerulonefropatie, v 10 případech nefrosklerosa, v 9 případech polycystická ledvina a v 5 případech nefrektomie pro tumor ledviny. Ve 26 případech byla příčina chronického renálního selhání jiná než výše uvedené příčiny. U 79 pacientů byla dialýza zahajována ráno (tj. cca v 7 hodin), u 64 pacientů dopoledne (cca ve 12 hodin) a 21 pacientů bylo dialyzováno večer (začátek cca v 18 hodin). 39 žen a 41 mužů mělo diabetes mellitus. Pacienti nedostávali 14 dní před započítáním studie žádné železo i.v.

3.3.2 Kontroly

Sledovali jsme také 40 zjevně zdravých kontrolních dobrovolných jedinců s normální funkcí ledvin (hladina kreatininu pod 100 μmol/l), pro které jako vylučovací kritérium z hlediska možné infekce platila hranice CRP>10 mg/l, která byla překročena u 3 z nich. Do souboru kontrolních jedinců bylo tak zahrnuto 37 osob, z toho 21 žen a 16 mužů ve

věku 21-92 let, průměrně 55±20 let. Vzorky byly u těchto osob odebírány v ranních hodinách.

Studie byla schválena etickou komisí a pacienti i kontrolní osoby podepsali informovaný souhlas.

3.3.3 Biochemická měření

Standardními metodami byly v laboratořích Ústavu klinické biochemie a hematologie změřeny parametry krevního obrazu (Coulter® LH 750, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA), železo, ferritin, transferrin, CRP, albumin a kreatinin (AU 2700 Beckman Coulter, Lismeehan, Irsko). Hepcidin v krevním séru byl změřen pomocí komerčně dostupného ELISA setu (Bachem, Merseyside, Velká Británie) na analyzátoru NexGen Four (Adaltis, Řím, Itálie), solubilní transferrinové receptory (sTfR) byly změřeny imunoturbidimetricky pomocí setu TinaQuant® sTfR (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) na analyzátoru AU 400 Beckman Coulter a interleukin 6 (IL-6) byl změřen pomocí ELISA setu (R&D Systems, Minneapolis, USA) na analyzátoru NexGen Four.

3.3.4 Statistika

Statistická analýza byla provedena pomocí programů Excel a MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgie). Rozdíly mezi skupinami pacientů a kontrol byly porovnány Mann-Whitneyovým testem a byly vyjádřeny jako medián (interkvartilové rozpětí).

Pro porovnání výsledků mezi podskupinami pacientů podle času jejich hemodialýzy byl proveden Kruskal-Wallisův test. Korelace biochemických parametrů byla provedena pomocí neparametrické Spearmanovy korelace.

3.3.5 Výsledky

Výsledky jsou shrnuty do tabulky 6. Sérové hladiny železa, transferrinu, albuminu a hemoglobinu byly u skupiny pacientů významně nižší ($p < 0,0001$), zatímco hladiny ferritinu ($p < 0,0001$), sTfR ($p < 0,05$), hepcidinu ($p = 0,0003$), CRP a IL-6 ($p < 0,0001$) byly významně vyšší než u skupiny kontrolních osob.

Tab. 4: Deskriptivní statistika skupiny dialyzovaných pacientů i jejich podskupin a kontrolní skupiny

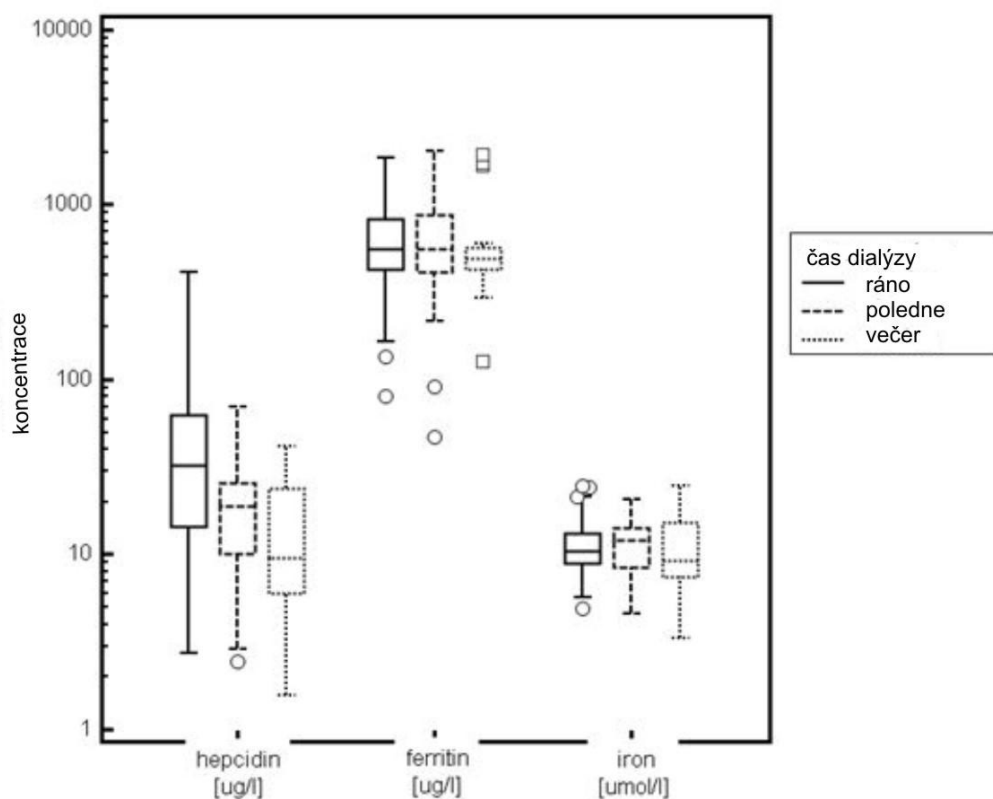
	DIALYZOVANÍ PACIENTI				KONTROLY (n = 37)	p-value***
	VŠICHNI (n = 164)	PODLE ČASU DIALÝZY				
		Ráno (n = 79)	poledne (n = 64)	večer (n = 21)		
Hemoglobin (g/l)	112* 104 - 121**	112 104 - 121	113 107 - 122	109 103 - 116	139 133 - 148	p<0,0001
hepcidin (µg/l)	21,2 9,8 - 36,9	32,1 14,5 - 62,2	18,8 10,1 - 25,7	9,6 6,0 - 23,9	10,4 7,5 - 17,5	p=0,0003
IL-6 (µg/l)	4,7 3,0 - 8,0	5,2 4,2 - 8,5	4,0 2,3 - 6,7	4,6 2,6 - 8,0	1,0 0,7 - 1,8	p<0,0001
albumin (g/l)	40,9 38,8 - 43,0	39,8 37,8 - 42,4	42,4 40,3 - 43,6	40,3 39,3 - 42,0	47,9 45,9 - 49,9	p<0,0001
CRP (mg/l)	3,0 1,0 - 8,0	4,0 2,0 - 7,0	2,0 1,0 - 8,0	3,0 1,0 - 8,0	1,0 1,0 - 2,0	p<0,0001
železo (µmol/l)	11,1 8,5 - 13,6	10,5 9,0 - 13,1	12,0 8,5 - 14,3	9,3 7,4 - 15,2	18,4 13,2 - 21,9	p<0,0001
ferritin (µg/l)	551 426 - 823	557 429 - 826	557 415 - 875	495 428 - 573	107 64 - 172	p<0,0001
transferrin (g/l)	1,78 1,52 - 1,98	1,62 1,43 - 1,88	1,87 1,65 - 2,10	1,81 1,53 - 1,92	2,59 2,43 - 2,83	p<0,0001
solubilní transferrinové receptory (mg/l)	2,99 2,25 - 3,87	2,94 2,34 - 3,78	3,03 2,18 - 3,83	2,99 2,34 - 4,24	2,51 2,32 - 3,19	p<0,05

* medián

** interkvartilové rozpětí

***statistická významnost mezi skupinou hemodialyzovaných pacientů a skupinou zdravých kontrol

Protože je známa diurnální variabilita koncentrace jak železa, tak hepcidinu [93, 94], byla skupina pacientů rozdělena do tří podskupin podle času jejich hemodialýzy na podskupiny ranní, polední a večerní. Hladiny železa vykazovaly tendenci k diurnální variabilitě, avšak nesignifikantně. Oproti tomu hladiny hepcidinu diurnální variabilitu vykazovaly poměrně zřetelně. Hladiny ferritinu nevykazovaly diurnální variabilitu vůbec (Obr. 8).



Obr. 8: Diurnální variabilita hepcidinu, ferritinu a železa. Vyjádřeno ve formě krabicových grafů.

Ve skupině pacientů i v podskupinách byly provedeny neparametrické korelace. Korelační koeficienty a p-hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7 a Tab. 8.

Neparametrická korelace ukázala slabé až velmi slabé, avšak statisticky významné korelace mezi parametry metabolismu železa a zánětu v celé skupině pacientů (Tab. 7). Železo pozitivně korelovalo s ferritinem a negativně se sTfR, CRP a IL-6. Ferritin pozitivně koreloval s IL-6 a hepcidinem a negativně se sTfR. Transferrin negativně koreloval s IL-6. U kontrolní skupiny nebyla nalezena žádná významná korelace hepcidinu s ostatními biochemickými parametry.

V podskupině pacientů, kteří absolvovali hemodialýzu v ranních hodinách, železo pozitivně korelovalo s ferritinem a záporně se sTfR a CRP, ferritin pozitivně koreloval s hepcidinem a záporně s transferrinem a IL-6 pozitivně koreloval s CRP a záporně s transferrinem (Tab. 8).

Tab. 5: Korelace v celé skupině dialyzovaných pacientů

Celá skupina hemodialyzovaných pacientů		
železo s ferritinem	r=0,31	p=0,0001
železo se sTfR	r=-0,42	p<0,0001
železo s CRP	r=-0,37	p<0,0001
železo s IL-6	r=-0,25	p=0,001
ferritin s IL-6	r=0,18	p=0,02
ferritin s hepcidinem	r=0,13	p=0,02
ferritin se sTfR	r=-0,26	p=0,001
IL-6 s transferrinem	r=-0,26	p=0,0006

Tab. 6: Korelace v jednotlivých podskupinách dialyzovaných pacientů

Ranní podskupina hemodialyzovaných pacientů		
železo s ferritinem	r=0,32	p<0,01
železo se sTfR	r=-0,38	p<0,001
železo s CRP	r=-0,31	p=0,005
ferritin s hepcidinem	r=0,28	p=0,01
ferritin s transferrinem	r=-0,34	p<0,01
IL-6 s CRP	r=0,37	p<0,005
IL-6 s transferrinem	r=-0,35	p<0,005
Dopolední podskupina hemodialyzovaných pacientů		
železo s CRP	r=-0,49	p<0,0001
železo s IL-6	r=-0,3	p=0,01
železo se sTfR	r=-0,26	p<0,05
ferritin se sTfR	r=-0,42	p=0,0005
ferritin s IL-6	r=0,35	p<0,005
ferritin s transferrinem	r=-0,34	p<0,01
IL-6 s CRP	r=0,34	p<0,01
Večerní podskupina hemodialyzovaných pacientů		
železo s ferritinem	r=0,49	p<0,05
železo se sTfR	r=-0,7	p<0,001
ferritin s sTfR	r=-0,53	p<0,05
IL-6 s CRP	r=0,62	p<0,005
CRP s hepcidinem	r=0,59	p<0,005

V podskupině pacientů, kteří prodělali hemodialýzu v poledne, korelovalo železo záporně s CRP, IL-6 a sTfR, ferritin koreloval pozitivně s IL-6 a sTfR a negativně s transferrinem a IL-6 pozitivně koreloval s CRP (Tab. 8).

V podskupině pacientů, kteří byli dialyzováni večer, železo pozitivně korelovalo s ferritinem a negativně se sTfR, ferritin negativně koreloval se sTfR a CRP pozitivně koreloval s IL-6 a také s hepcidinem. U této skupiny byly korelační koeficienty vyšší než u předchozích dvou podskupin, je však třeba podotknout, že v této podskupině bylo podstatně méně pacientů než u podskupin ranní a polední (Tab. 8).

3.4 Studie Hepcidin u pacientů po transplantaci ledviny

3.4.1 Design studie

V období březen – říjen 2009 bylo v pražském Institutu klinické a experimentální medicíny provedeno 90 transplantací kadaverosní ledviny u pacientů, kteří byli zařazeni do naší studie. Tito pacienti pak byli průběžně sledováni, pro naše potřeby tak proběhly odběry biologického materiálu v den transplantace (odběr č. 0), odběr č. 1 proběhl 1-5 dní po transplantaci (průměrně 2,7 dne po transplantaci, medián 3 dny), odběr č. 2 proběhl 6-10 dní po transplantaci (průměrně 7,9 dne po transplantaci, medián 8 dní), odběr č. 3 proběhl 10-21 dní po transplantaci (průměr 13,9 dne, medián 14 dní po transplantaci), odběr č. 4 proběhl zhruba 3 měsíce po transplantaci a odběr č. 5 proběhl cca 6 měsíců po transplantaci, přičemž 6 měsíců po transplantaci proběhl odběr č. 5 u pacientů, kde byla funkce jejich transplantovaného štěpu méně stabilní. Do naší studie pak byli zařazeni ti pacienti, kteří podstoupili odběry biologického materiálu č. 0, 1, 2, 3, 4, a ti, kteří podstoupili doplňkový odběr č. 5. Všechny takto popsání odběry biologického materiálu podstoupilo celkem 71 pacientů. V odebraném biologickém materiálu byla provedena stanovení běžných laboratorních parametrů (krevní obraz, renální funkce, parametry metabolismu železa, celková bílkovina, CRP) i speciálních vyšetření (interleukin-6, hepcidin). Naším cílem bylo zjistit, jak se mění jednotlivé parametry metabolismu železa v čase po transplantaci ledviny.

3.4.2 Charakteristika souboru pacientů

V souboru bylo celkem 71 pacientů, z toho 43 mužů a 28 žen. Průměrný věk mužů byl 56,3 let (medián 58 let), přičemž nejmladšímu pacientovi bylo 33 let, nejstaršímu 83 let. Průměrný věk žen byl 55,1 let (medián 59 let), nejmladší pacientce bylo 28 let a nejstarší 76 let. 58 pacientů bylo zařazeno v chronickém dialyzačním programu, 12 pacientů bylo dialyzováno pomocí peritoneální dialýzy a jedna pacientka byla ve stadiu predialýzy. Průměrný počet měsíců strávený na hemodialýze byl 31 měsíců (medián 24 měsíců),

minimální doba závislosti na hemodialýze byla 5 měsíců, nejdelší doba byla 127 měsíců. Etiologie chronického renálního selhání byla ve 28 případech glomerulonefritida (tato skupina zahrnuje chronickou glomerulonefritidu, membranózní glomerulonefritidu, IgA glomerulonefritidu, fokálně segmentální glomerulosklerosu (FSGS), rychle progredující glomerulonefritidu (RPGN), lupusovou nefritidu a ANCA asociovanou vaskulitidu), v 9 případech tubulární intersticiální nefritidu (chronická tubulární intersticiální nefritida, chronická pyelonefritida a toxicita cyklosporinu A), v 10 případech polycystickou chorobu ledvin, v 10 případech nefrosklerózu, v 11 případech diabetickou nefropatii a ve 3 případech vedly k selhání ledvin jiné důvody (1 x obstrukční uropatie a 2 x byly příčiny nejasné).

Všem pacientům byla transplantována kadaverosní ledvina. V 59 případech šlo u pacientů o první transplantaci, v 11 případech o druhou transplantaci a u jedné pacientky šlo o třetí transplantaci.

Čas studené ischemie (CIT – cold ischemia time, tj. čas od vyjmutí ledviny z těla dárce do našití ledviny do těla příjemce) byl průměrně 17 hodin a 25 minut (medián 17 hodin 13 minut), minimální CIT byl 11 hodin 50 minut, maximální CIT byl 26 hodin 32 minut. U jedné pacientky se CIT nepodařil dohledat, neboť nebyl uveden v operačním protokolu. Manipulační čas (MT, tj. čas od vynětí ledviny z přepravního kontejneru do našití ledviny do těla příjemce) byl průměrně 25 minut (medián 24 minut), minimálně 13 a maximálně 60 minut. U 2 pacientek se tento čas nedohledal, neboť nebyl uveden v operačním protokolu.

U pacientů čekajících na transplantaci se v určitých časových úsecích stanovují hladiny tzv. panel reaktivních protilátek (PRA). Ty určují procento ledvin, které se nebudou pro příjemce hodit. U našeho souboru máme k dispozici dvě hodnoty těchto hladin – historicky nejvyšší hladinu PRA a aktuální hladinu PRA. Průměrná historická hladina PRA byla 15,4 % (medián 8 %, nejnižší 0% a nejvyšší 87 %), průměrná aktuální hodnota PRA byla 11,6 % (medián 2 %, nejnižší 0 %, nejvyšší 78 %). Pacienti s PRA pod 20 % jsou nesenzibilizovaní, pacienti s PRA 20-80 % jsou středně senzibilizovaní a pacienti s PRA nad 80 % jsou hypersenzibilizovaní. Aktuálně nesenzibilizovaných pacientů bylo 57, počet středně senzibilizovaných byl 14 a žádný pacient nebyl aktuálně hypersenzibilizován.

U 8 pacientů byl HLA mismatch 2, u 24 pacientů 3, u 29 pacientů 4, u 9 pacientů 5 a u jednoho pacienta byl HLA mismatch 6.

Před transplantací mělo 15 pacientů diabetes mellitus, z toho 6 z nich se léčilo užíváním perorálních antidiabetik a 9 z nich muselo být léčeno inzulínem. Po transplantaci bylo diabetiků 18, z toho 4 na léčbě perorálními antidiabetiky a 14 se léčilo inzulínem. Ischemickou chorobou srdeční trpělo 17 pacientů.

8 pacientům byl před transplantací podáván Simulect (basiliximab), 18 pacientů dostávalo thymoglobulin.

43 pacientů bylo po transplantaci léčeno kombinací léků mykofenolát mofetil (Cellcept, Myfortic), kortikosteroidy (Prednison, Léčiva) a tacrolimus (Prograf, Advagraf). 15 pacientů bylo léčeno kombinací cyklosporinu A (Consupren, Sandimun Neoral), mykofenolát mofetilu a kortikosteroidů. 3 pacienti byli léčeni kombinací cyklosporin A, mykofenolát mofetil, kortikosteroidy a PF. 2 pacienti dostávali enzymatickou léčbu sotrastaurinem (Novartis AEB071). U 3 pacientů došlo ke změně imunosupresivní léčby z kombinace mykofenolát mofetil, kortikosteroidy a takrolimus na kombinaci cyklosporin A, mykofenolát mofetil a kortikosteroidy. U dvou pacientů došlo k opačnému postupu. 3 pacienti začali být léčeni kombinací mykofenolát mofetil a kortikosteroidy, po určité době byl k této léčbě nasazen ještě takrolimus.

Opožděnou funkci štěpu, tj. nutnost dialýzy i po transplantaci, mělo 34 pacientů ze 71. U 68 pacientů byla 3 měsíce po transplantaci provedena protokolární biopsie s vyhodnocením dle Banffských kritérií. Mimo protokolární biopsii byla funkce štěpu sledována dle hladiny kreatininu či výskytu teploty. Časná akutní rejekce se objevila u 12 pacientů. Funkce štěpu se hodnotila 3 měsíce po transplantaci. Jako dobrá funkce ledviny se považovala hladina kreatininu do 120 $\mu\text{mol/l}$ (u 22 pacientů), 38 pacientů mělo hladinu kreatininu v rozmezí 120-200 $\mu\text{mol/l}$ a u 11 pacientů byla hladina kreatininu nad 200 $\mu\text{mol/l}$.

3.4.3 Odběr biologického materiálu a provedená stanovení

Odběr biologického materiálu byl proveden podle platných doporučení do odběrového systému Vacuette. V centrálních laboratořích Institutu klinické a experimentální medicíny byla provedena běžným způsobem stanovení krevního obrazu a renálních funkcí (kreatinin, močovina) na analyzátoch firmy Abbott. Pro speciální stanovení byla srážlivá i nesrážlivá krev zcentrifugována, sérum či plazma byly rozděleny do jednotlivých alikvotů a zamraženy. Po nasbírání určitého počtu vzorků byly vždy jednotlivé série vzorků na suchém ledu odeslány do Ústavu klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni, kde byly uschovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější použití. Zde byla posléze provedena stanovení parametrů metabolismu železa (železo, ferritin, transferrin, solubilní transferrinové receptory), celkové bílkoviny, CRP, interleukinu-6 a hepcidinu, a to standardními laboratorními metodami na analyzátoch AU 640 a AU 400 Beckman Coulter (železo, ferritin, transferrin, CRP, celková bílkovina a sTfR) či ELISA metodami na analyzátoru NexGen Four (IL-6 (souprava BioVendor), hepcidin (souprava DRG)) podle návodů udaných výrobcí jednotlivých souprav. Hepcidin byl stanoven pomocí kompetitivní ELISA

techniky s myší monoklonální protilátkou, na kterou se vázal buď hepcidin ze vzorku, nebo biotinylovaný hepcidin, který byl detekován pomocí streptavidinu značeného křenovou peroxidasou.

3.4.4 Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programů MS Excel, MedCalc, SAS a Statistica za pomoci ing. Stanislava Kormundy. Byly použity následujících testy: Friedmanova ANOVA, repeated ANOVA, Wilcoxonův test, pořadová korelace a párový znaménkový test.

3.4.5 Výsledky

3.4.5.1 Statistická deskripce, vývoj v čase, změna mezi časem 1 – 4 a grafy vývoje jednotlivých analytů

V Tab. 9 je uvedena statistická deskripce hladin měřených parametrů v jednotlivých časech.

Tab. 7: Statistická deskripce hladin měřených parametrů v jednotlivých časech

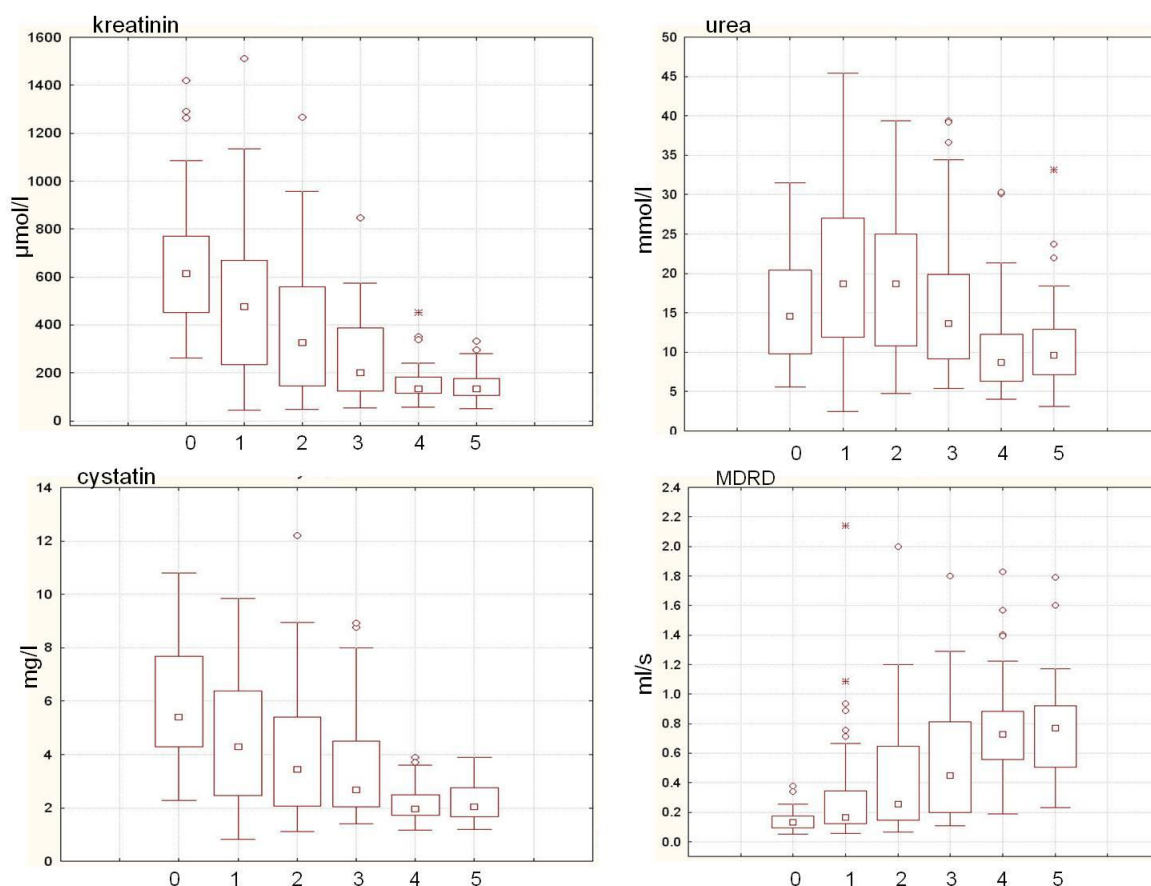
	číslo odběru					
	0	1	2	3	4	5
	n=71	n=71	n=71	n=71	n=71	n=57
kreatinin [μmol/l]	614,9* 451-769**	478 235-670	328 147-558	200 124-386	134 115-183	132 106-176
urea [mmol/l]	14,6 9,8-20,4	18,7 11,9-27,0	18,7 10,8-25,0	13,6 9,2-19,9	8,7 6,3-12,3	9,6 7,1-12,9
cystatin c [mg/l]	5,39 4,30-7,67	4,30 2,47-6,38	3,45 2,07-5,40	2,68 2,05-4,51	1,97 1,72-2,48	2,03 1,67-2,47
MDRD [ml/s]	0,13 0,09-0,17	0,17 0,12-0,34	0,26 0,14-0,65	0,45 0,20-0,81	0,73 0,56-0,89	0,77 0,50-0,92
erythrocyty [x 10 ¹²]	3,95 3,64-4,24	3,24 2,89-3,56	3,23 2,99-3,48	3,11 2,92-3,45	4,03 3,56-4,33	4,13 3,96-4,72
hematokrit	0,377 0,356-0,410	0,303 0,280-0,336	0,302 0,277-0,333	0,293 0,270-0,328	0,367 0,331-0,391	0,377 0,349-0,407
hemoglobin [g/l]	126 119-137	102 94-113	103 94-111	100 91-108	123 110-133	128 117-139
střední objem erythrocytů [fl]	95 91-98	96 92-99	95 91-99	94 91-97	92 88-96	90 85-93
celková bílkovina [g/l]	81 77-86	61 56-66	65 60-69	65 62-70	72 68-76	77 73-81
CRP [mg/l]	4 2-10	29 15-38	11 7-26	5 2-10	2 1-6	3 1-8
IL-6 [μg/l]	2,5 1,4-4,4	4,9 2,6-10,0	3,8 1,9-7,5	2,9 1,4-6,8	1,6 0,5-4,3	2,0 0,8-3,6
hepcidin [μg/l]	58,3 40,6-75,0	54,3 42,7-77,0	62,6 40,9-76,1	58,0 39,2-75,7	64,0 42,1-86,7	60,1 42,5-81,2
železo [μmol/l]	15,1 11,3-20,8	8,7 6,1-14,0	15,3 12,7-19,5	14,0 9,6-19,9	15,5 11,7-19,8	17,1 10,6-21,8
ferritin [μg/l]	565 286-892	481 266-761	606 326-854	641 324-898	463 203-836	469 196-912
transferrin [g/l]	1,96 1,62-2,17	1,36 1,2-1,59	1,62 1,35-1,86	1,75 1,51-2,08	1,98 1,78-2,30	2,21 1,83-2,45
saturace transferrinu	0,31 0,21-0,45	0,24 0,18-0,41	0,39 0,27-0,58	0,32 0,20-0,48	0,29 0,20-0,40	0,31 0,19-0,40
solubilní transferrinové receptory [mg/l]	3,23 2,66-4,23	2,39 1,79-3,29	2,34 1,79-3,06	2,50 1,80-3,23	4,16 3,24-5,09	3,69 2,85-4,54

*medián

** interkvartilové rozpětí

Na Obr. 9 lze vidět trend kreatininu, urey, cystatinu a MDRD v čase.

Podle výsledků Friedmanovy anovy byly změny v hladinách kreatininu, urey, cystatinu c i MDRD mezi jednotlivými časovými obdobími významné ($p < 0,000001$). Podle párového znaménkového testu došlo mezi časy 0, tedy před transplantací ledviny, a 4, tedy 3 měsíce po transplantaci ledviny, k významnému poklesu hladin kreatininu, urey a cystatinu c ($p < 0,0001$) a k významnému vzestupu odhadu glomerulární filtrace ($p < 0,0001$), což je v souladu s klesajícím kreatininem či cystatinem c.

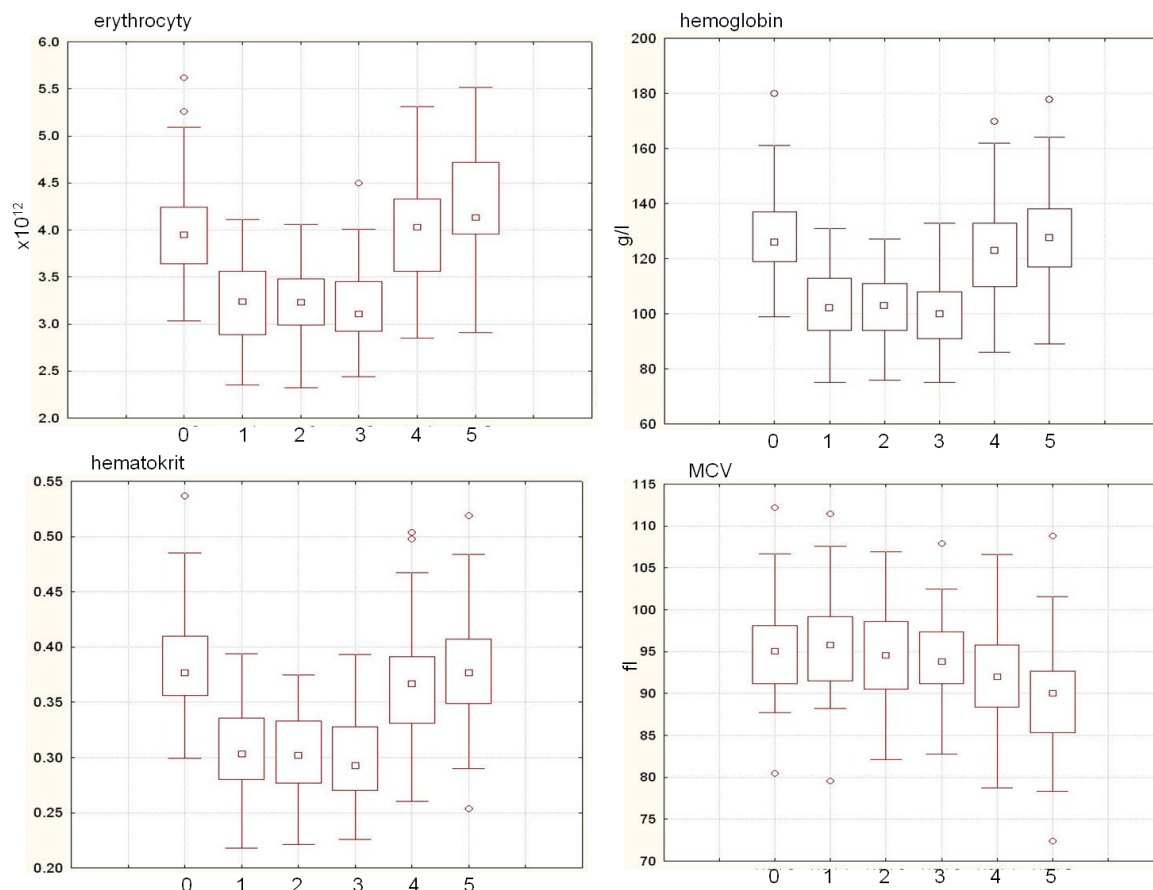


Obr. 9: Trend vývoje kreatininu, urey, cystatinu c a MDRD v čase

Na Obr. 10 lze vidět trend počtu erythrocytů, hladiny hemoglobinu, hematokritu a středního objemu erythrocytů v čase

Podle výsledků Friedmanovy anovy byly změny v počtu erythrocytů, hladinách hemoglobinu, v hematokritu i ve středním objemu erythrocytů mezi jednotlivými časovými obdobími významné ($p < 0,000001$). Zejména v období po transplantaci došlo k velkému poklesu počtu erythrocytů, hemoglobinu i hematokritu v důsledku krevních ztrát při výkonu a v důsledku příjmu většího množství tekutin. Podle párového znaménkového testu však mezi časy 0, tedy před transplantací ledviny, a 4, tedy 3 měsíce po transplantaci ledviny,

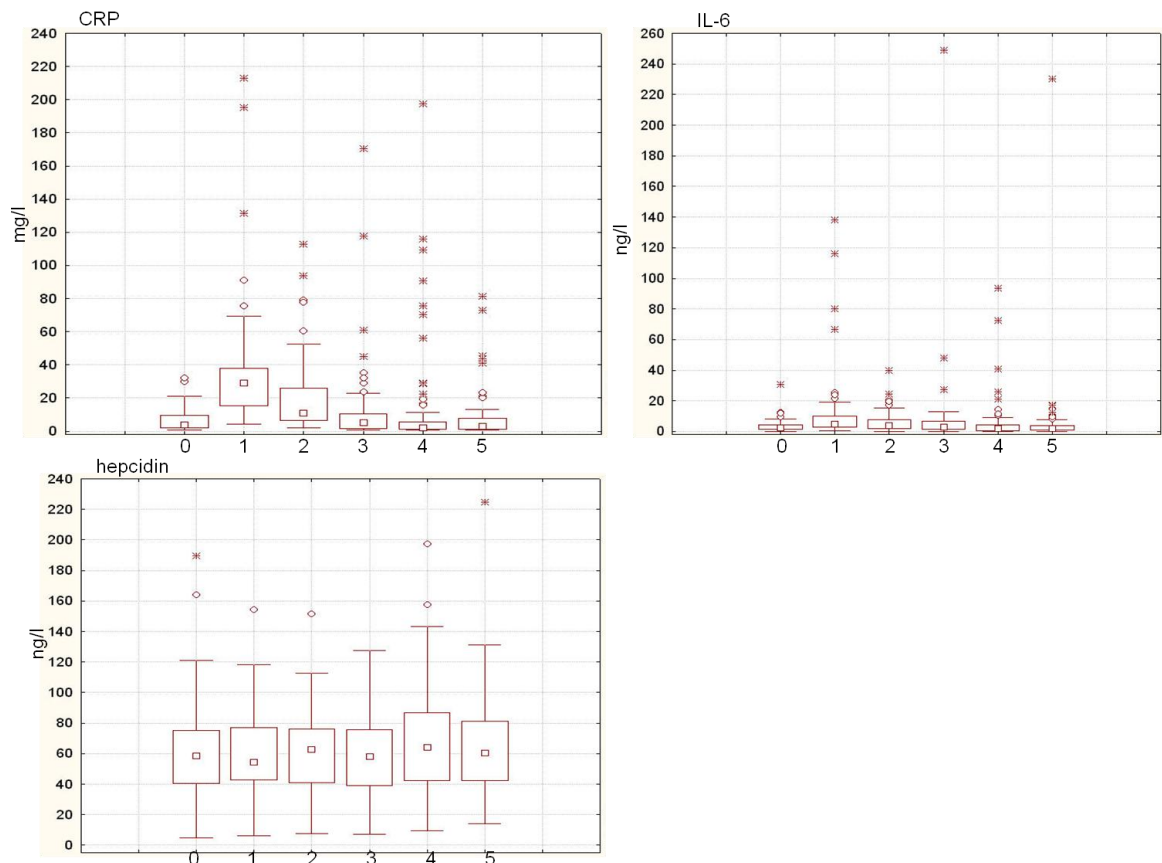
k významnému poklesu nebo vzestupu počtu erythrocytů a hematokritu nedošlo, došlo však k významnému poklesu hemoglobinu ($p=0,0385$) a k poklesu středního objemu erythrocytů ($p<0,0001$).



Obr. 10: Trend vývoje erythrocytů, hemoglobinu, hematokritu a středního objemu erythrocytů v čase

Na Obr. 11 lze vidět trend hladin CRP, IL-6 a hepcidinu v čase. Podle výsledků Friedmanovy anovy byly změny v CRP a IL-6 mezi jednotlivými časovými obdobími významné ($p<0,000001$), zejména v období po transplantaci došlo k velkému zvýšení jejich hladin zřejmě v důsledku zátěže při samotné transplantaci. Naopak změny v hladinách hepcidinu mezi jednotlivými časovými obdobími významné nebyly.

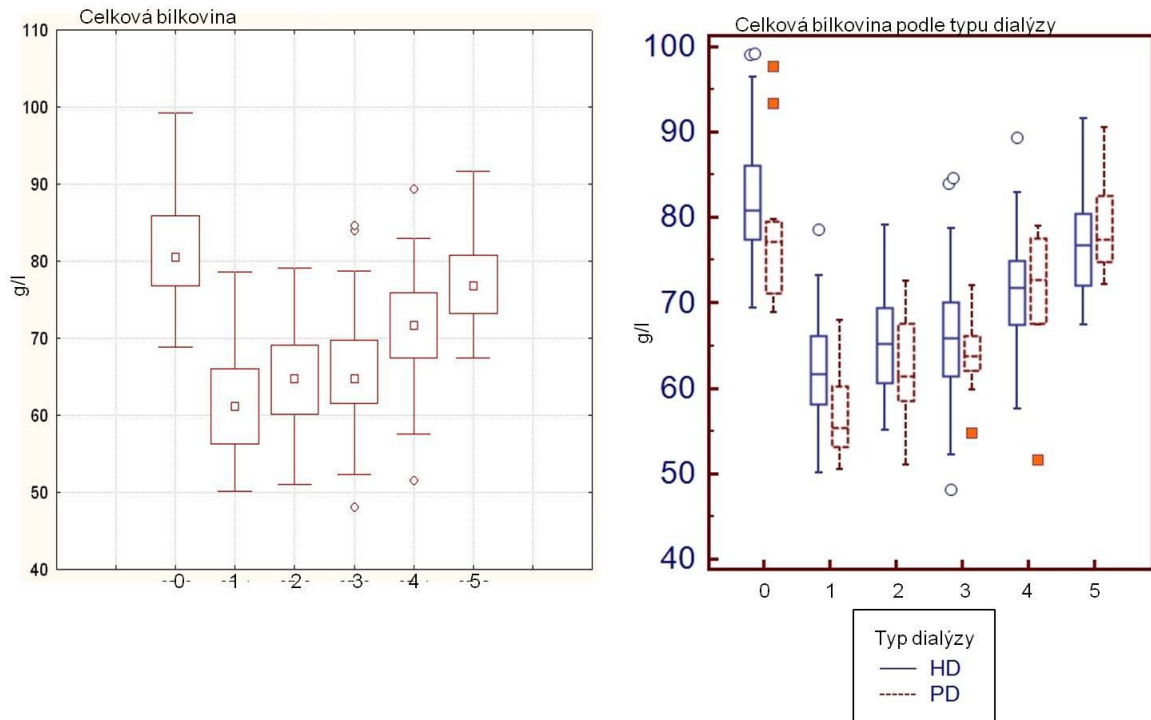
Podle párového znaménkového testu však mezi časy 0, tedy před transplantací ledviny, a 4, tedy 3 měsíce po transplantaci ledviny, nedošlo k významnému poklesu nebo vzestupu hladin CRP, IL-6 ani hepcidinu.



Obr. 11: Trend vývoje CRP, IL-6 a hepcidinu v čase

Na Obr. 12 lze vidět trend hladin celkové bílkoviny v čase. Podle výsledků Friedmanovy anovy byly změny v hladinách mezi jednotlivými časovými obdobími významné ($p < 0,000001$). V období před transplantací byli pacienti dialyzováni, bohužel ale nevíme, jak dlouho před výkonem se tak stalo. Jak ukazuje graf, významně vyšší hladinu celkové bílkoviny před transplantací měli hemodialyzovaní pacienti, u pacientů na peritoneální dialýze hladiny nebyly tak vysoké. Postupem času se pak rozdíl v obou skupinách setřely.

V období po transplantaci došlo k velkému poklesu hladiny celkové bílkoviny, pravděpodobně v důsledku krevních ztrát při výkonu a v důsledku příjmu většího množství tekutin. Podle párového znaménkového testu došlo mezi časy 0, tedy před transplantací ledviny, a 4, tedy 3 měsíce po transplantaci ledviny, došlo k významnému poklesu hladiny celkové bílkoviny.

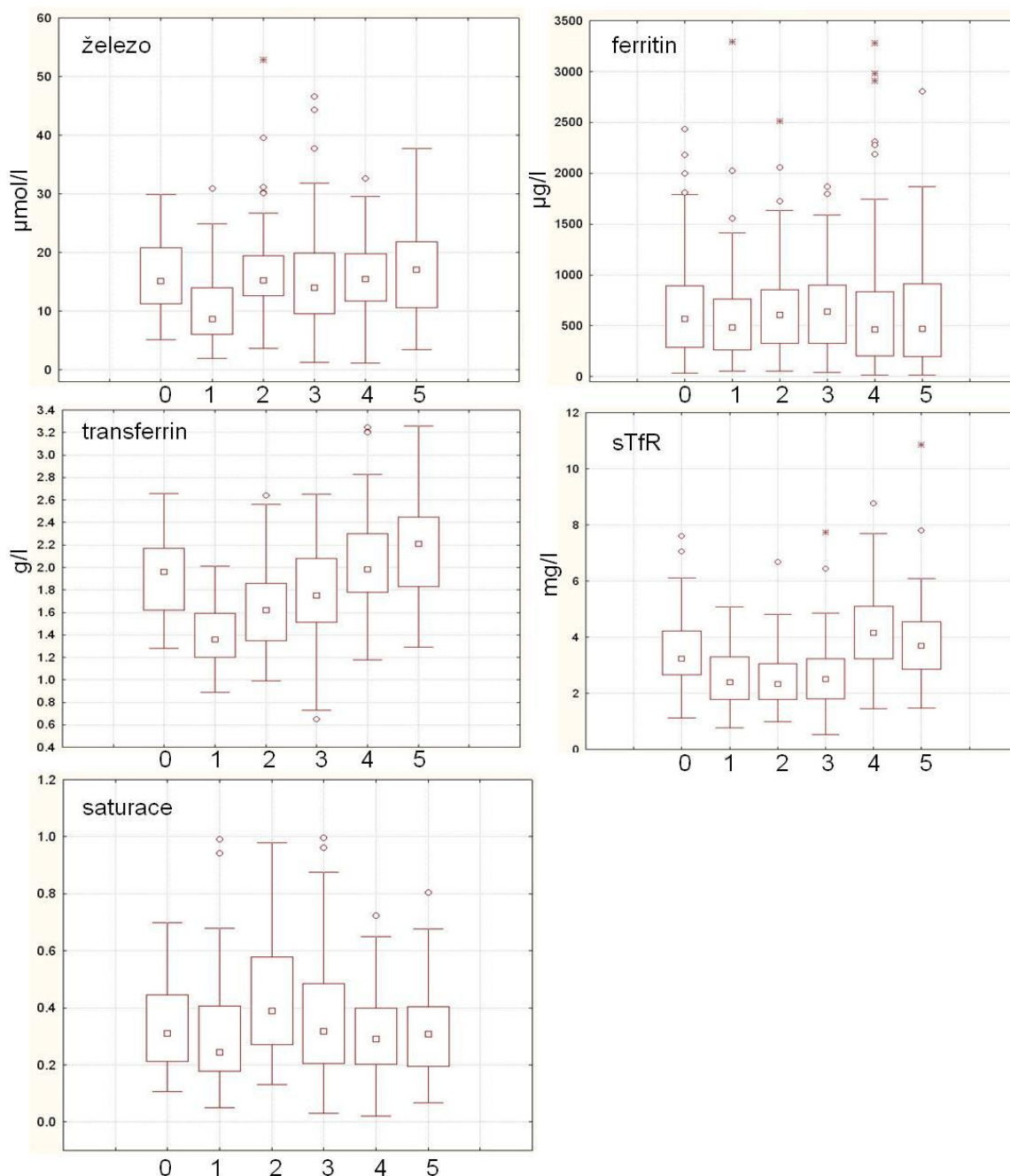


Obr. 12: Trend celkové bílkoviny v čase (vlevo) a trend celkové bílkoviny v čase podle typu dialýzy (vpravo)

Na Obr 13. lze vidět trend hladin železa, ferritinu, transferrinu, saturace transferrinu a solubilních transferrinových receptorů v čase. Podle výsledků Friedmanovy anovy byly změny ve všech parametrech metabolismu železa mezi jednotlivými časovými obdobími významné (železo, transferrin, saturace transferrinu, solubilní transferrinové receptory $p < 0,000001$; ferritin $p < 0,00003$).

Zejména v období po transplantaci došlo k poklesu hladiny železa zřejmě v důsledku krevních ztrát při výkonu a v důsledku reakce organismu na zátěž. Pokles hladiny transferrinu v období po transplantaci může souviset také s tím, že transferrin je negativní akutní marker, postupné zvyšování hladiny transferrinu pravděpodobně souvisí s celkovým zlepšováním stavu pacientů, a to včetně výživy.

Podle párového znaménkového testu došlo mezi časy 0, tedy před transplantací ledviny, a 4, tedy 3 měsíce po transplantaci ledviny, k významnému vzestupu hladiny transferrinu ($p = 0,04$) a hladiny sTfR ($p = 0,0018$), u ostatních parametrů železa k významnému poklesu či vzestupu hladiny nedošlo.



Obr. 13: Trend vývoje železa, ferritinu, transferrinu, solubilních transferrinových receptorů a saturace transferrinu v čase

3.4.5.2 Korelace parametrů metabolismu železa s parametry zánětu, funkce ledvin a ukazatele krvevotby v jednotlivých časech

V čase 0, tedy v čase před transplantací ledviny, silně významně korelovalo železo se saturací, slabá korelace byla mezi železem a ferritinem a železem a hepcidinem. Negativní středně silná významná závislost byla prokázána mezi železem a sTfR. Transferrin koreloval se saturací, cystatinem c, interleukinem-6, ferritinem, CRP

a s hemoglobinem. Solubilní transferrinové receptory korelovaly negativně se saturací a slabě pozitivně s hemoglobinem, CRP a interleukinem-6. Ferritin významně pozitivně koreloval se saturací a negativně s kreatininem a hepcidin slabě pozitivně koreloval se saturací.

Jednotlivé korelační koeficienty (r) a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 8: Korelace v čase 0

korelace v čase 0	r	p
železo se saturací	0,92475	<0,0001
železo se sTfR	-0,53676	<0,0001
železo s ferritinem	0,335	0,0043
železo s hepcidinem	0,24652	0,0382
transferrin se saturací	-0,44101	0,0001
transferrin s cystatinem c	-0,37015	0,0015
transferrin s IL-6	-0,33735	0,004
transferrin s ferritinem	-0,32903	0,0051
transferrin s hemoglobinem	0,25484	0,032
transferrin s CRP	-0,23469	0,0488
sTfR se saturací	-0,52215	<0,0001
sTfR s hemoglobinem	0,26351	0,0264
sTfR s CRP	0,26367	0,0263
sTfR s IL-6	0,24789	0,0371
ferritin se saturací	0,4186	0,0003
ferritin s kreatininem	-0,29099	0,0138
hepcidin se saturací	0,25712	0,0304

V čase 1, tj. v brzkém čase po transplantaci pozitivně korelovalo železo se saturací a negativně se sTfR, CRP a interleukinem-6. Transferrin negativně koreloval se saturací a CRP a pozitivně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s hemoglobinem, CRP a interleukinem-6. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a CRP a negativně s transferrinem. Hemoglobin negativně koreloval se saturací a pozitivně s CRP. Saturace negativně korelovala s CRP.

Jednotlivé korelační koeficienty a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 9: Korelace v čase 1

korelace v čase 1	r	p
železo se saturací	0,91905	<0,0001
železo se sTfR	-0,34923	0,0028
železo s CRP	-0,43782	0,0001
železo s IL-6	-0,28667	0,0154
transferrin se saturací	-0,36962	0,0015
transferrin se sTfR	0,32761	0,0053
transferrin s CRP	-0,2417	0,0423
sTfR se saturací	-0,40379	0,0005
sTfR s hemoglobinem	0,30429	0,0099
sTfR s CRP	0,293	0,0131
sTfR s IL-6	0,26355	0,0264
ferritin se saturací	0,2275	0,0564
ferritin s transferrinem	-0,29579	0,0123
ferritin s CRP	0,26412	0,026
hemoglobin se saturací	-0,31696	0,0071
hemoglobin s CRP	0,30879	0,0088
saturace s CRP	-0,32571	0,0056

V čase 2, tj. v čase 2 týdny po transplantaci pozitivně korelovalo železo se saturací a ferritinem a negativně se sTfR a CRP. Transferrin negativně koreloval se saturací, CRP, ferritinem a cystatinem c. Ferritin pozitivně koreloval se saturací, interleukinem-6 a CRP. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s CRP, hemoglobin negativně koreloval s interleukinem-6 a cystatinem c. Saturace pozitivně korelovala s cystatinem c a hepcidin negativně koreloval s cystatinem c.

Jednotlivé korelační koeficienty a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 10: Korelace v čase 2

korelace v čase 2	r	p
železo se saturací	0,89909	0,0001
železo se sTfR	-0,4816	0,0001
železo s CRP	-0,2744	0,0206
železo s ferritinem	0,2485	0,0366
transferrin se saturací	-0,441	0,0001
transferrin s CRP	-0,43423	0,0002
transferrin s ferritinem	-0,34663	0,0031
transferrin s cystatinem c	-0,26179	0,0274
ferritin se saturací	0,34619	0,0031
ferritin s IL-6	0,32224	0,0061
ferritin s CRP	0,24153	0,0424
sTfR se saturací	-0,51853	<0,0001
sTfR s CRP	0,3029	0,0102
hemoglobin s IL-6	-0,29949	0,0112
hemoglobin s cystatinem c	-0,2435	0,0407
saturace s cystatinem c	0,25119	0,0346
hepcidin s cystatinem c	-0,23688	0,0467

V čase 3, tj. měsíc po transplantaci ledviny, korelovalo pozitivně železo se saturací a ferritinem a negativně se sTfR a CRP. Transferrin negativně koreloval s CRP, saturací, interleukinem-6, ferritinem a cystatinem c a pozitivně se sTfR. Ferritin pozitivně koreloval s interleukinem-6, saturací a CRP. Hemoglobin negativně koreloval s kreatininem, cystatinem c a CRP. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací, cystatinem c, kreatininem a pozitivně s hemoglobinem a saturace pozitivně korelovala s cystatinem c.

Jednotlivé korelační koeficienty a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 11: Korelace v čase 3

korelace v čase 3	r	p
železo se saturací	0,88924	<0,0001
železo se sTfR	-0,38457	0,0009
železo s CRP	-0,31679	0,0071
železo s ferritinem	0,30996	0,0085
transferrin s CRP	-0,47695	<0,0001
transferrin se saturací	-0,34908	0,0028
transferrin se sTfR	0,33991	0,0037
transferrin s IL-6	-0,33376	0,0044
transferrin s ferritinem	-0,28635	0,0155
transferrin s cystatinem c	-0,23934	0,0444
ferritin s IL-6	0,43151	0,0002
ferritin se saturací	0,36773	0,0016
ferritin s CRP	0,33238	0,0046
hemoglobin s kreatininem	-0,30649	0,0093
hemoglobin s cystatinem c	-0,29346	0,013
hemoglobin s CRP	-0,26008	0,0285
sTfR se saturací	-0,49854	<0,0001
sTfR s cystatinem c	-0,40244	0,0005
sTfR s kreatininem	-0,34844	0,0029
sTfR s hemoglobinem	0,30887	0,0088
saturace s cystatinem c	0,26485	0,0256

V čase 4, tedy v čase 3 měsíce po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací a negativně s CRP, interleukinem-6 a sTfR. Transferrin negativně koreloval s ferritinem, saturací, interleukinem-6 a CRP a pozitivně s hemoglobinem a sTfR. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a negativně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s hemoglobinem. Hpcidin pozitivně koreloval s hemoglobinem a negativně s kreatininem a cystatinem c. Saturace transferrinu negativně korelovala s CRP a interleukinem-6 a hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c a kreatininem.

Jednotlivé korelační koeficienty a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 12: Korelace v čase 4

korelace v čase 4	r	p
železo se saturací	0,85949	<0,0001
železo s CRP	-0,4751	<0,0001
železo s IL-6	-0,4081	0,0004
železo se sTfR	-0,25594	0,0312
transferrin s ferritinem	-0,60499	<0,0001
transferrin se saturací	-0,42215	0,0002
transferrin s hemoglobinem	0,41645	0,0003
transferrin se sTfR	0,38287	0,001
transferrin s IL-6	-0,29878	0,0114
transferrin s CRP	-0,28084	0,0177
ferritin se saturací	0,42867	0,0002
ferritin se sTfR	-0,27868	0,0186
sTfR se saturací	-0,41418	0,0003
sTfR s hemoglobinem	0,2531	0,0332
hepcidin s hemoglobinem	0,28463	0,0161
hepcidin s kreatininem	-0,28495	0,016
hepcidin s cystatinem c	-0,2373	0,0463
saturace s CRP	-0,32159	0,0062
saturace s IL-6	-0,2588	0,0293
hemoglobin s cystatinem c	-0,44733	<0,0001
hemoglobin s kreatininem	-0,24737	0,0375

V čase 5, tedy v čase 6 měsíců po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací, ferritinem a hemoglobinem a negativně s CRP, sTfR a interleukinem-6. Transferrin negativně koreloval s ferritinem, interleukinem-6, cystatinem c a saturací a pozitivně se sTfR a hemoglobinem. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a negativně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s CRP a interleukinem-6. Hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c, CRP, kreatininem a interleukinem-6 a pozitivně se saturací. Saturace negativně korelovala s CRP a interleukinem-6 a hepcidin negativně koreloval s kreatininem.

Jednotlivé korelační koeficienty a hodnoty statistické významnosti (p-value) jsou uvedeny v Tab. 15.

Tab. 13 Korelace v čase 5

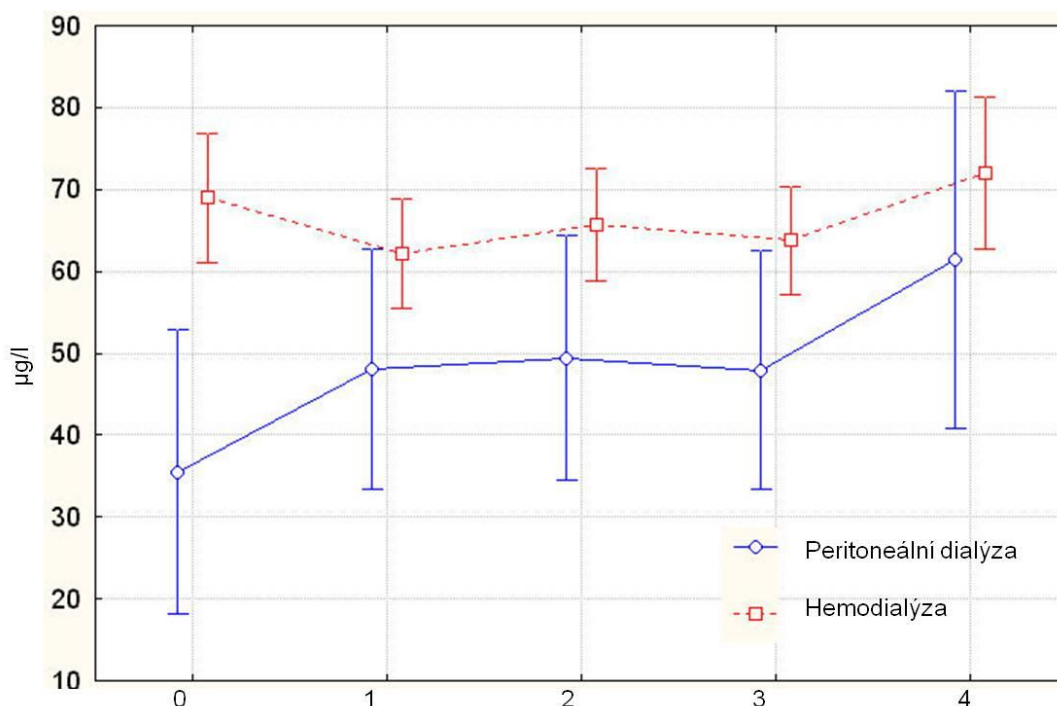
korelace v čase 5	r	p
železo se saturací	0,93915	<0,0001
železo s CRP	-0,53445	<0,0001
železo se sTfR	-0,46863	0,0002
železo s ferritinem	0,44104	0,0006
železo s hemoglobinem	0,39338	0,0025
železo s IL-6	-0,36904	0,0047
transferrin s ferritinem	-0,57175	<0,0001
transferrin s IL-6	-0,35042	0,0075
transferrin se sTfR	0,30192	0,0225
transferrin s hemoglobinem	0,26822	0,0437
transferrin s cystatinem c	-0,26667	0,0449
transferrin se saturací	-0,26483	0,0465
ferritin se saturací	0,59421	<0,0001
ferritin se sTfR	-0,35938	0,006
sTfR se saturací	-0,56166	<0,0001
sTfR s CRP	0,32101	0,0149
sTfR s IL-6	0,28485	0,0317
hemoglobin s cystatinem c	-0,48998	0,0001
hemoglobin s CRP	-0,32805	0,0127
hemoglobin s kreatininem	-0,29811	0,0243
hemoglobin se saturací	0,28988	0,0287
hemoglobin s IL-6	-0,27175	0,0409
saturace s CRP	-0,49061	0,0001
saturace s IL-6	-0,27616	0,0376
hepcidin s kreatininem	-0,2644	0,0469

3.4.5.3 Repeated ANOVA

Pro zjištění, zda se jednotlivé parametry metabolismu železa, zánětu či erythropoesy nějak lišily v závislosti na skupině pacientů v čase, byla provedena také repeated (opakovaná) ANOVA. Pacienti byli rozděleni podle pohlaví, typu dialýzy (hemodialýza, peritoneální dialýza), etiologie chronického renálního selhání, přítomnosti opožděné funkce štěpu, rozvoje akutní rejekce štěpu, podle typu imunosupresní léčby a podle toho, zda dostali před transplantací indukční léčbu. Jako časové období bylo určeno časové období mezi náběry 0 a 4. Náběr č. 5 nebyl zahrnut do této analýzy, protože pro tuto

metodu je třeba hodnotit pouze pacienty, kteří mají všechny náběry ve všech časech, což bylo splněno pouze v obdobích 0 až 4.

Pro jednotlivé parametry byly nalezeny významné rozdíly pouze ve skupině rozdělené podle pohlaví, kdy u mužů byly hladiny sTfR významně vyšší než u žen, a ve skupině podle typu dialyzační léčby (Obr. 14), kde hepcidin byl v čase významně vyšší u hemodialyzovaných pacientů než u peritoneálně dialyzovaných pacientů ($p=0,0499$).



Obr. 14: Repeated ANOVA-trend hepcidinu ve skupině peritoneálně dialyzovaných pacientů a ve skupině hemodialyzovaných pacientů. Grafy jsou znázorněny jako průměr \pm 95% konfidenční interval.

3.5 Diskuse

V první studii, která měla pilotní charakter, byla měřena hladina hepcidinu u hemodialyzovaných pacientů. Naším cílem bylo určit asociace hepcidinu s jednotlivými parametry metabolismu železa a zánětu. Železo negativně korelovalo se sTfR a CRP, což znamená, že čím je vyšší zánět, tím více je železo ukryto v organismu, aby nemohlo být využíváno bakteriemi [95], tím víc ale chybí pro erythropoesu. Odpovídající jsou i negativní korelace ferritinu s transferrinem a pozitivní korelace transferrinu se sTfR. Hecpidin významně koreloval se železem, transferrinem, solubilními transferrinovými receptory a saturací transferrinu. Tyto korelace byly sice významné, ale pouze středně silné až slabé. Vzhledem k tomu, že tvorba hepcidinu je podporována zánětem [30], čekali jsme, že hladina hepcidinu bude korespondovat s hladinou CRP. To se však neprokázalo.

Hepcidin v této studii nekoreloval ani s ferritinem, který je také považován za pozitivní protein akutní fáze.

V druhé studii byla měřena také hladina hepcidinu u většího souboru dialyzovaných pacientů. Naším cílem bylo opět určit, jak spolu souvisí jednotlivé parametry metabolismu železa a zánětu. U celé skupiny pacientů shodně s první studií korelovalo železo s CRP a se solubilními transferrinovými receptory, ve shodě s tím korelovalo také s IL-6. U ferritinu, který je považován za marker zánětu, se očekávalo, že bude reflektovat hladiny CRP, to se však nestalo, s IL-6 byla prokázána jen velmi slabá korelace, s hepcidinem koreloval sice pořád významně, ale jen velmi slabě.

Pacienti byli rozděleni do skupin podle času jejich hemodialýzy na ranní, dopolední a večerní podskupiny. Předpokládaná korelace hepcidinu s ferritinem byla pouze v ranní podskupině, byla sice významná, ale slabá. Středně silná korelace hepcidinu s CRP se objevila u večerní podskupiny pacientů, kde byla také zároveň nejnižší hodnota mediánu hepcidinu ze všech tří podskupin, ale také nejmenší počet zařazených pacientů. V dopolední podskupině ještě ferritin slabě koreloval s IL-6 – zde šlo o jedinou korelaci mezi těmito dvěma proteiny akutní fáze. To by naznačovalo, že ferritin není u těchto pacientů zcela vhodný marker zánětu a že jeho hladina je spíše zvýšena v důsledku nadbytku nevyužitelného železa v organismu. U ostatních parametrů nenastala žádná překvapení, chovaly se podle předpokladů – negativní korelace železa a zánětlivých markerů, železa a sTfR, ferritinu s transferrinem a vzájemná pozitivní korelace zánětlivých markerů a železa s ferritinem.

Druhá studie naznačila, jak obtížné je hodnocení hladin parametrů železa u dialyzovaných pacientů. Hladiny železa a hepcidinu jsou za normálních okolností ovlivněny diurnálním rytmem, navíc oba parametry vykazují intra- a interindividuální variabilitu [23, 96, 97]. Všeobecně se předpokládá, že hladiny železa jsou vyšší v ranních hodinách než v hodinách pozdějších [98, 99], objevily se ale i studie, které ukázaly buď nejvyšší hladinu železa v odpoledních hodinách [100, 101], nebo prokázaly významnou variabilitu během dne, ale bez systematického trendu [102]. U hepcidinu se předpokládá, že během dne koresponduje s hladinou železa [70]. V naší studii se však ukázal jen velmi slabě vyjádřený diurnální rytmus hladin železa. U hemodialyzovaných pacientů by mohl být ovlivněn narušením přirozeného režimu den-noc v důsledku hemodialyzační léčby [103] a také substituční léčbou preparáty železa a zásobami železa v organismu, a to i přesto, že pacienti dva týdny před zahájením studie nedostávali žádnou i.v. léčbu železem.

Naproti tomu u hepcidinu byla diurnální variabilita vyjádřena poněkud výrazněji. Ve studii, kterou provedl Ashby a kol. [93], však žádná diurnální variabilita hepcidinu

u hemodialyzovaných pacientů nalezena nebyla, u kontrolních osob však ano. Je možné, že samotná dialyzační procedura má vliv jak na hladinu hepcidinu, tak na jeho diurnální variabilitu. Hladina hepcidinu může být také ovlivněna jeho poměrně vysokou intraindividuální variabilitou, která se pohybuje přes 20% [94, 97], někde dokonce až 85% [96].

Hepcidin je velmi malá molekula, má pouze 25 aminokyselin a molekulovou hmotnost 3 kDa. Proto by měl být podle předpokladů eliminován z organismu během dialýzy. Studie, které se tímto zabývaly, však nepřinesly jednoznačné závěry. Jedna studie neprokázala žádnou eliminaci hepcidinu během dialýzy [93], další ukázaly pokles hepcidinu během dialýzy [104–107], někde dokonce s návratem hladiny hepcidinu na bazální hodnotu po 1 hodině [105] od ukončení dialýzy nebo setrvání na bazální hladině do příští dialýzy [106]; jinde došlo k poklesu hepcidinu jen u některých hemodialyzovaných pacientů [108]. Vzhledem k tomu, že eliminace hepcidinu prostřednictvím dialýzy by mohl být jeden z cílů léčby, mohl by se výzkum posunout i do této oblasti. Zajímavý by byl jistě i pohled na to, jak interaguje hepcidin s různými typy dialyzačních membrán. Také typ dialyzační léčby může mít svůj vliv na hladinu hepcidinu. Repeated (opakovaná) ANOVA provedená u třetí studie ukázala, že u pacientů léčených peritoneální dialýzou byly hladiny hepcidinu v časech 0, 1, 2, 3 a 4 významně nižší než u pacientů léčených hemodialýzou. Již dříve bylo ukázáno, že u peritoneálně dialyzovaných a hemodialyzovaných pacientů se zachovanou reziduální funkcí ledvin byly hladiny hepcidinu významně nižší než u anurických pacientů [109, 110], což by nasvědčovalo tomu, že zachovaná reziduální funkce ledvin má na hladinu hepcidinu zásadní vliv. U transplantovaných pacientů ze třetí studie byla průměrná reziduální renální funkce (hodnocena jako reziduální diuresa) před transplantací 907 ml (medián 750 ml). Žádná asociace s předtransplantační hladinou hepcidinu se však neprokázala. Oproti tomu se u náběrů 2, 4 a 5 prokázaly slabé, avšak statisticky významné negativní korelace hepcidinu s markery funkce ledvin (kreatinin, cystatin c). Tato korelace je opačná oproti očekávání, že s poklesem kreatininu či cystatinu c v souladu se zlepšující se funkcí štěpu bude zároveň klesat i hepcidin. Je možné, že erythropoetin, produkováný transplantovanou ledvinou, stimuloval erytropoezu (rostl počet ery i koncentrace hemoglobinu), a proto i stoupala produkce hepcidinu.

Naše studie ukázala, že hladiny zánětlivých markerů (CRP, IL-6, hepcidinu a ferritinu) byly významně vyšší u hemodialyzovaných pacientů než u zdravých kontrol. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve získanými daty [111]. Tvorba hepcidinu je podporována přítomností zánětu. V naší studii však hepcidin koreloval s ferritinem a IL-6 jen velmi slabě. Skutečnost, že tento vztah nebyl těsnější, naznačuje, že hladina hepcidinu

u hemodialyzovaných pacientů není ovlivněna je zánětem, ale možná i retencí hepcidinu či vysokými zásobami železa. U pacientů s Crohnovou chorobou byla totiž prokázána velmi silná asociace mezi hepcidinem a ferritinem a mezi hepcidinem a IL-6 [112].

Vysoké hladiny ferritinu mají také vliv na imunitní odpověď hemodialyzovaných pacientů na vakcínu proti chřipce. Ve studii, která byla provedena ve spolupráci s naším pracovištěm, byl zkoumán vztah metabolismu železa a imunitní odpovědi na vakcínu proti chřipce. U pacientů s dobrou odpovědí na očkování byly hladiny ferritinu významně nižší (medián 571 mg/l) než u tzv. non-respondérů (medián 821 mg/l). Hladiny hepcidinu mezi těmito dvěma skupinami se nelišily [113].

U pacientů po transplantaci ledviny jsme předpokládali, že hladiny ferritinu i hepcidinu budou postupně klesat s tím, jak bude fungovat transplantovaná ledvina, která začne produkovat erythropoetin, tudíž dojde ke zlepšení erythropoesy. Navíc odezní zánět udržovaný chronickou dialýzou, což povede k tomu, že železo se uvolní ze zásob a bude se moci lépe utilizovat, a také přestane pravděpodobná retence hepcidinu v důsledku nastupující funkce štěpu. Skutečnost však byla taková, že ferritin, který je považovaný za ukazatel zásob železa v organismu, vykázal v průběhu 6 měsíců jen mírnou sestupnou tendenci. Hladina ferritinu vyšší než 500 mg/l se u dialyzovaných pacientů posuzuje jako známka nedostatku železa v organismu (podle KDOQI). Procentuální zastoupení pacientů s hladinou ferritinu vyšší než 500 mg/l, čili s nedostatkem železa v organismu, bylo před transplantací (odběr 0) 56,3%, den po transplantaci (odběr 1) 45,1%, týden po transplantaci (odběr 2) 56,3%, 2 týdny po transplantaci (odběr 3) 60,6%, 3 měsíce po transplantaci (odběr 4) 45,1% a 6 měsíců po transplantaci 49,1%. Podle našich výsledků jde stále o tytéž pacienty. Ani u hepcidinu nedošlo k poklesu tak, jak jsme předpokládali. Ani u skupiny pacientů s hladinou ferritinu vyšší než 500 mg/l nebyl žádný významný vztah mezi hladinami ferritinu a hepcidinu.

Jedním z důvodů, proč hladina hepcidinu po transplantaci neklesala, by mohl být zlepšený nutriční stav pacientů. Ti často po transplantaci ledviny přibydou na hmotnosti, většinou jde ale o tuk a ne o svaly [114, 115]. Tuková tkáň také produkuje hepcidin jako odpověď na systémový zánět [116] i na zánět, probíhající přímo v ní [117]. Spekuluje se i o možné další regulaci hladiny hepcidinu, kterou má na svědomí stres způsobený malnutricí [118]. Ten by mohl také přispívat ke zvýšené hladině hepcidinu v předtransplantačním období (i v období hemodialýzy).

Hepcidin byl původně objeven jako peptid s antimikrobiálními vlastnostmi, které vykazoval jak proti plísním a kvasinkám (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*), tak proti bakteriím (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus carnosus*,

Streptococcus skupiny B, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus) [21, 22]. Až posléze se zjistilo, že hepcidin hraje klíčovou úlohu v regulaci metabolismu železa. Jeho cílovou molekulou je ferroportin, jediný dosud známý exportér železa z buňky. Navázáním hepcidinu na ferroportin dojde k degradaci ferroportinu, čímž železo zůstává uzamčeno uvnitř buňky a nemůže tak být využito pro tvorbu červených krvinek. Expresi hepcidinu je podporována tvorbou zánětlivých cytokinů, jako je IL-6. Transplantace orgánu je pro organismus velká zátěž, musí být potlačována vlastní imunita, aby nedocházelo k rejekci transplantované ledviny. Nabízí se otázka, zda nezůstává hepcidin v „trvalé pohotovosti“, aby se v organismu zabránilo vzniku infekce tím, že železo zůstává v buňce uzamčeno i nadále. To, že se podle výsledků párového znaménkového testu hladiny ferritinu významně nezměnily, by tomu nasvědčovalo. Možný je vznik začarovaného kruhu, kdy železo uzavřené v makrofázích indukuje expresi zánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α , které indukují expresi hepcidinu. Hpcidin se naváže na ferroportin, čímž dojde k uzamčení dalšího železa v buňce [95].

Hpcidin se v organismu vyskytuje jak v bioaktivní formě o 25 aminokyselinách, tak ve formách o 22 a 20 aminokyselinách. Ty mají zřejmě jen antimikrobiální funkci; hepcidin-20 se zvyšoval u pacientů po akutním infarktu myokardu [119]. Byly však detekovány jak v moči, tak v séru [21, 22, 104]. Jak již bylo uvedeno výše, stanovení hepcidinu je poměrně komplikované. Nejprve byl hepcidin-25 identifikován v lidském séru metodou hmotnostní spektrometrie [21]. Pak byl izolován hepcidin-25 společně s hepcidinem-20 z moči metodou iontoměničové chromatografie a HPLC s reverzní fází [22]. Prozatím není shoda na tom, jaká metoda je pro stanovení hepcidinu nejlepší. Navíc jeho stanovení není prozatím obecně rozšířené, protože s sebou přináší řadu technických komplikací (nejen pro to, že hepcidin je velmi malá molekula a není tedy sama o sobě antigen, navíc je mezidruhově velmi podobná, proto tvorba protilátky je složitá, ale také pro složitost izolace hepcidinu z moči, kde se vyskytuje v komplexech; navíc tyto metody jsou časově náročné). Nejprve se zdálo, že pro studování metabolismu železa bude vhodnější hepcidin izolovaný z moči, protože hepcidin v séru byl pro stávající metody pod jejich detekčním limitem. Byly úspěšně vyvinuty metody pro jeho stanovení v moči [3, 68], takové stanovení ale nejde použít anurických pacientů. Pak byla vyvinuta metoda SELDI-TOF-MS, která pomohla v detekci hepcidinu také u pacientů s renálním selháním [108]. Následovaly další metody stanovení-LC-MS/MS [69] či mikro-HPLC-MS/MS s izotopovou dilucí [120], které jako interní standard používaly hepcidinu nepodobný peptid, což s sebou neslo problémy s přesností a reprodukovatelností. V další práci byl pro metodu LC-MS/MS použit uměle syntetizovaný hepcidin jako standard a izotopově značený hepcidin jako interní standard, pro přítomnost endogenního hepcidinu v lidském

séru bylo jako matrix použito králičí sérum [73]. Mezi další problémy spojené se stanovením hepcidinu patří nejednotnost v mezích detekce a v normálech. Skoro desetinásobný rozdíl v limitu detekce byl u stanovení hepcidinu v moči pomocí metod SELDI-TOF a imunodot [33, 74]. Podobný rozdíl byl i mezi stanoveními metodou ELISA [70] a radioimunoanalytickým stanovením [93], a to 5 µg/l, resp. 0,5 µg/l. Také u referenčních mezí není situace jednoznačná. U prvního imunoanalytického stanovení byly hodnoty mezi 5. a 95. percentilem 29-254 µg/l u mužů a 18-288 µg/l u žen, u radioimunoanalytického byly normály 2-55 µg/l u zdravých dobrovolníků. U pacientů s mírným chronickým renálním selháním se normální hodnoty hepcidinu pohybovaly od 3,1 do 153,0 µg/l s mediánem 26,5 µg/l, u dialyzovaných pacientů se normální hodnoty pohybovaly od 27,6 do 158,0 µg/l s mediánem 58,5 µg/l. U jiné ELISA metody [107] byl medián hepcidinu u pacientů s chronickým renálním selháním 269,9 µg/l, u dialyzovaných dětí byl 652,4 µg/l a u zdravých dobrovolníků byl 72,9 µg/l. Bez zajímavosti není ani to, že v jedné studii [121] byla porovnána metoda ELISA s metodou SELDI TOF-MS a korelace nebyla příliš vysoká ($r=0,863$, $p=0,027$). Tato korelace však byla provedena jen na 6 patientských vzorcích.

Ve všech 3 našich studiích byl hepcidin měřen pomocí komerčně dostupných ELISA souprav – firmy Bachem UK a firmy DRG. U první studie na 40 hemodialyzovaných pacientech byl medián hepcidinu 141,9 µg/l a rozmezí mezi 5. a 95. percentilem 5,0-435,1 µg/l. U druhé studie, kde byli srovnáváni hemodialyzovaní pacienti a zdraví dobrovolníci, byl medián hepcidinu 21,2 µg/l u pacientů, resp. 10,4 µg/l u kontrol a rozmezí mezi 5. a 95. percentilem 3,2-98,5 µg/l, resp. 2,3-32,9 µg/l. U těchto dvou studií byl hepcidin změřen stejným setem firmy Bachem UK. U studie provedené na pacientech po transplantaci ledviny byl hepcidin měřen pomocí ELISA soupravy firmy DRG. Mediány v jednotlivých časech byly následující 58,3 µg/l, 54,3 µg/l, 62,6 µg/l, 58,0 µg/l, 64,0 µg/l, 60,1 µg/l a rozmezí mezi 5. a 95. percentilem byly 25,5-119,1 µg/l, 27,4-101,3 µg/l, 29,0-98,7 µg/l, 28,7-109,3 µg/l, 26,6-136,5 µg/l a 27,2-115,7 µg/l. Ani naše výsledky měřené stejným setem na podobné skupině pacientů se neshodují. V tomto bych viděla jistou limitaci této práce.

Další limitací této práce je ve studii na transplantovaných pacientech to, že u nich došlo v pooperačním období vlivem krevních ztrát a příjmu infuzních roztoků k velkému „naředění“ plazmy. To ovlivnilo hladinu celkové bílkoviny, kde došlo mezi náběry před transplantací a po transplantaci k poklesu v mediánech o 20 g/l. Takové naředění ale jistě mohlo ovlivnit i hladinu dalších parametrů, nejen celkové bílkoviny. Pacienti byli před transplantací dialyzováni na svých spádových střediscích, nepodařilo se však dohledat čas od poslední dialýzy k transplantaci, protože tento údaj se normálně neuvádí.

Poté, co byla objasněna funkce hepcidinu, začala velká očekávání slibných výsledků. Pro naplnění jeho potenciálu je však třeba, aby byly dostatečně vyřešeny preanalytické a analytické aspekty jeho stanovení. Už teď je ale o hepcidin velký zájem nejen v oblasti nefrologie a hematologie, ale i v jiných. Nahlíží se na něj jako na možný ukazatel kardiovaskulárního rizika u pacientek se syndromem polycystických ovarií, a to zejména u těch obézních z důvodu zánětu podporovaného tukovou tkání [122]. Hecpidin by také mohl být používán jako jeden z ukazatelů v prognostickém modelu pro vývoj primární myelofibrozy [123]. Byl také stanovován u pacientů s akutní exacerbací plicní cystické fibrosy, kde po podání systémové antibiotické terapie došlo k významnému poklesu jeho hladiny, většina pacientů ale i poté měla výraznou hypoferrémii v důsledku nedostatečné erythropoesy [124]. U novorozenců s velmi nízkou porodní váhou by mohl sloužit i jako jeden z dalších markerů sepse [125]. Poměr hepcidin:ferritin by mohl v budoucnu sloužit i jako ukazatel poškození jaterní tkáně v důsledku cirhosisy jater, kde u pacientů trpících cirhosou byl tento poměr významně snížený v porovnání s kontrolní skupinou [126]. U pacientek s mentální anorexií byly hladiny hepcidinu i ferritinu významně zvýšeny i přes nepřítomnost zánětlivého stavu, poté co pacientky začaly přijímat potravu, ferritin i hepcidin významně poklesly. Je proto možné, že existuje další regulační mechanismus pro tvorbu hepcidinu, který souvisí s se stresem způsobeným malnutricí. I proto by mohl hepcidin sloužit také jako ukazatel malnutrice [118].

4 ZÁVĚR

Během posledních deseti let došlo v důsledku objevení hepcidinu jako klíčového regulátoru metabolismu železa k velkému posunu ve znalostech o metabolismu železa. Hecpidin se jeví jako velice slibná molekula, která by měla pomáhat v posouzení stavu metabolismu železa u pacientů s nejrůznějšími chorobami. My jsme se v této práci zaměřili na pacienty s terminálním onemocněním ledviny léčené hemodialýzou nebo transplantací ledviny, u kterých je pozorována anémie a současně chronický zánětlivý stav, tedy faktory významně ovlivňující produkci hepcidinu. Naším cílem bylo zhodnotit, jakou roli hraje hepcidin v metabolismu železa a jak se mění jednotlivé poměry v metabolismu železa u těchto pacientů.

Na našem pracovišti jsme provedli celkem tři studie, kde jsme se zabývali vztahem hepcidinu a ukazatelů zánětu, erythropoesy a parametrů metabolismu železa u pacientů s terminálním onemocněním ledviny.

První studie byla pilotní a měla ukázat, jak spolu souvisí hepcidin a ostatní parametry metabolismu železa u 40 hemodialyzovaných pacientů. Zde byla prokázána slabá, avšak významná korelace hladiny hepcidinu s hladinou železa, hladinou transferrinu, hladinou solubilních transferrinových receptorů a se saturací transferrinu.

Ve druhé studii byly porovnány parametry metabolismu železa, ukazatele zánětu a ukazatele erythropoesy u skupiny 164 hemodialyzovaných pacientů a u skupiny 37 kontrolních osob bez postižení ledvin. Zde bylo prokázáno, že hladiny železa, transferrinu, albuminu a hemoglobinu byly u skupiny pacientů významně nižší, zatímco hladiny ferritinu, solubilních transferrinových receptorů, hepcidinu, CRP a IL-6 byly významně vyšší než u skupiny kontrolních osob. Pacienti byli také rozděleni do tří podskupin podle času, kdy podstoupili hemodialýzu, a to pro posouzení vlivu diurnálního rytmu železa a hepcidinu. U železa byla patrná tendence nejvyšších hladin u pacientů dialyzovaných v poledne, avšak nebyla významná. U hepcidinu byla diurnální variabilita vyjádřena mnohem silněji s nejvyššími hladinami u ranní podskupiny a s poklesem v průběhu dne. Ve skupině pacientů i v podskupinách byly provedeny neparаметrické korelace, které ukázaly slabé až velmi slabé, avšak statisticky významné korelace mezi parametry metabolismu železa a zánětu v celé skupině pacientů. Železo pozitivně korelovalo s ferritinem a negativně se sTfR, CRP a IL-6. Ferritin pozitivně koreloval s IL-6 a hepcidinem a negativně se sTfR. Transferrin negativně koreloval s IL-6. U kontrolní skupiny nebyla nalezena žádná významná korelace hepcidinu s ostatními biochemickými parametry. V podskupině pacientů, kteří absolvovali hemodialýzu v ranních hodinách,

železo pozitivně korelovalo s ferritinem a záporně se sTfR a CRP, ferritin pozitivně koreloval s hepcidinem a záporně s transferrinem a IL-6 pozitivně koreloval s CRP a záporně s transferrinem. V podskupině pacientů, kteří prodělali hemodialýzu v poledne, korelovalo železo záporně s CRP, IL-6 a sTfR, ferritin koreloval pozitivně s IL-6 a sTfR a negativně s transferrinem a IL-6 pozitivně koreloval s CRP. V podskupině pacientů, kteří byli dialyzováni večer, železo pozitivně korelovalo s ferritinem a negativně se sTfR, ferritin negativně koreloval se sTfR a CRP pozitivně koreloval s IL-6 a také s hepcidinem. U této skupiny byly korelační koeficienty vyšší než u předchozích dvou podskupin, je však třeba podotknout, že v této podskupině bylo podstatně méně pacientů než u podskupin ranní a polední.

Třetí studie byla provedena na 71 pacientech, kterým byla transplantovaná kadaverosní ledvina. Tito pacienti byli sledováni před transplantací (čas 0), den po transplantaci (čas 1), týden po transplantaci (čas 2), 2 týdny po transplantaci (čas 3), 3 měsíce po transplantaci (čas 4) a u těch, kde štěp nebyl po 3 měsících stabilní, také 6 měsíců po transplantaci (čas 5). Cílem bylo zhodnotit, jak se u těchto pacientů budou měnit parametry metabolismu železa, ukazatele zánětu a erythropoesy a jak se budou tyto parametry lišit u skupin pacientů podle různých kritérií.

Hladiny kreatininu, urey i cystatinu c se po transplantaci podle očekávání snížily a odhad glomerulární filtrace podle MDRD vzrostl. Hladiny erythrocytů, hemoglobinu, hematokrit a střední objem erythrocytů se v čase měnily, změny byly dány především po transplantaci tím, že u pacientů došlo ke krevním ztrátám a také příjmu většího množství infuzí, jak dokládá i pokles celkové bílkoviny v potransplantačním období. Celkově však došlo akorát k významnému poklesu hladiny hemoglobinu a k poklesu středního objemu erythrocytu. Změny v hladinách CRP a IL-6 mezi jednotlivými časovými obdobími byly významné, zejména v období po transplantaci došlo k velkému zvýšení jejich hladin zřejmě v důsledku zátěže při samotné transplantaci. Naopak změny v hladinách hepcidinu mezi jednotlivými časovými obdobími významné nebyly. Za celé časové období však nedošlo k významné změně v hladinách CRP, IL-6 či hepcidinu. Ve všech parametrech metabolismu železa byly změny mezi jednotlivými časovými obdobími významné, zejména v období po transplantaci došlo k poklesu hladiny železa zřejmě v důsledku krevních ztrát při výkonu a v důsledku reakce organismu na zátěž. Za celé časové období pak došlo k významnému vzestupu hladiny transferrinu a hladiny sTfR, u ostatních parametrů železa k významnému poklesu či vzestupu hladiny nedošlo.

V čase 0, tedy v čase před transplantací ledviny, silně významně korelovalo železo se saturací, slabá korelace byla mezi železem a ferritinem a železem a hepcidinem. Negativní středně silná významná závislost byla prokázána mezi železem a sTfR.

Transferrin koreloval se saturací, cystatinem c, interleukinem-6, ferritinem, CRP a s hemoglobinem. Solubilní transferrinové receptory korelovaly negativně se saturací a slabě pozitivně s hemoglobinem, CRP a interleukinem-6. Ferritin významně pozitivně koreloval se saturací a negativně s kreatininem a hepcidin slabě pozitivně koreloval se saturací. V čase 1, tj. v brzkém čase po transplantaci pozitivně korelovalo železo se saturací a negativně se sTfR, CRP a interleukinem-6. Transferrin negativně koreloval se saturací a CRP a pozitivně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s hemoglobinem, CRP a interleukinem-6. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a CRP a negativně s transferrinem. Hemoglobin negativně koreloval se saturací a pozitivně s CRP. Saturace negativně korelovala s CRP. V čase 2, tj. v čase 2 týdny po transplantaci pozitivně korelovalo železo se saturací a ferritinem a negativně se sTfR a CRP. Transferrin negativně koreloval se saturací, CRP, ferritinem a cystatinem c. Ferritin pozitivně koreloval se saturací, interleukinem-6 a CRP. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s CRP, hemoglobin negativně koreloval s interleukinem-6 a cystatinem c. Saturace pozitivně korelovala s cystatinem c a hepcidin negativně koreloval s cystatinem c. V čase 3, tj. měsíc po transplantaci ledviny, korelovalo pozitivně železo se saturací a ferritinem a negativně se sTfR a CRP. Transferrin negativně koreloval s CRP, saturací, interleukinem-6, ferritinem a cystatinem c a pozitivně se sTfR. Ferritin pozitivně koreloval s interleukinem-6, saturací a CRP. Hemoglobin negativně koreloval s kreatininem, cystatinem c a CRP. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací, cystatinem c, kreatininem a pozitivně s hemoglobinem a saturace pozitivně korelovala s cystatinem c. V čase 4, tedy v čase 3 měsíce po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací a negativně s CRP, interleukinem-6 a sTfR. Transferrin negativně koreloval s ferritinem, saturací, interleukinem-6 a CRP a pozitivně s hemoglobinem a sTfR. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a negativně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s hemoglobinem. Hpcidin pozitivně koreloval s hemoglobinem a negativně s kreatininem a cystatinem c. Saturace transferrinu negativně korelovala s CRP a interleukinem-6 a hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c a kreatininem. V čase 5, tedy v čase 6 měsíců po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací, ferritinem a hemoglobinem a negativně s CRP, sTfR a interleukinem-6. Transferrin negativně koreloval s ferritinem, interleukinem-6, cystatinem c a saturací a pozitivně se sTfR a hemoglobinem. Ferritin pozitivně koreloval se saturací a negativně se sTfR. Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací a pozitivně s CRP a interleukinem-6. Hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c,

CRP, kreatininem a interleukinem-6 a pozitivně se saturací. Saturace negativně korelovala s CRP a interleukinem-6 a hepcidin negativně koreloval s kreatininem.

Pro zjištění, zda se jednotlivé parametry metabolismu železa, zánětu či erythropoesy nějak lišily v závislosti na skupině pacientů v čase, byla provedena také repeated (opakovaná) ANOVA. Pacienti byli rozděleni podle pohlaví, typu dialýzy (hemodialýza, peritoneální dialýza), etiologie chronického renálního selhání, přítomnosti opožděné funkce štěpu, rozvoje akutní rejekce štěpu, podle typu imunosupresní léčby a podle toho, zda dostali před transplantací indukční léčbu. Jako časové období bylo určeno časové období mezi náběry 0 a 4. Pro jednotlivé parametry byly nalezeny významné rozdíly pouze ve skupině rozdělené podle pohlaví, kdy u mužů byly hladiny sTfR významně vyšší než u žen, a ve skupině podle typu dialyzační léčby, kde hepcidin byl v čase významně vyšší u hemodialyzovaných pacientů než u peritoneálně dialyzovaných pacientů.

Naše výsledky ukázaly, že hodnocení stavu metabolismu železa u pacientů s terminálním onemocněním ledviny je poměrně obtížné. Očekávali jsme, že hepcidin, považovaný i za jeden z markerů zánětu, bude kopírovat hladiny zánětlivých ukazatelů, jako jsou CRP a IL-6. Zároveň se předpokládalo, že bude existovat závislost mezi úrovní glomerulární filtrace nebo reziduální funkce ledvin a hladinou hepcidinu. Hladiny hepcidinu a zánětlivých markerů byly sice vyšší u hemodialyzovaných pacientů ve srovnání s kontrolními osobami, mezi těmito parametry se ale jak u pacientů, tak u kontrol neprokázala žádná výrazná asociace; pokud existovala korelace, byla slabá.

Zdá se, že hladina hepcidinu u hemodialyzovaných pacientů je ovlivněná celou řadou faktorů, které na ni působí komplexně. Určitě mezi ně patří zánět, který ale možná nemá nejzásadnější vliv, dále třeba i anémie, hypoxie, retence hepcidinu, tvorba hepcidinu tukovou tkání při zlepšení nutričního stavu, snaha zabránit infekci, diurnální variabilita hepcidinu či jeho intra-individuální variabilita.

Vyzkoušeli jsme měření hepcidinu celkem dvěma komerčně dostupnými ELISA sety. Ty mají oproti měření hepcidinu pomocí chromatografických metod a metod hmotnostní spektrometrie výhodu v tom, že nekladou příliš velké nároky na přístrojové vybavení laboratoře a také na erudici personálu. Nevýhodou pro stanovení hepcidinu je jeho malá velikost a mezidruhová podobnost, čímž je tvorba protilátky komplikovanější. Od roku 2000, kdy byl hepcidin objeven, byl však učiněn velký pokrok v metodách pro jeho stanovení. Doposud však nejsou zcela dořešeny některé preanalytické, analytické a klinické aspekty. Až se podaří toto vyřešit, bude teprve možné opravdu říci, jak moc užitečný je hepcidin v posouzení stavu metabolismu železa v organismu. Snahy pro zlepšení této situace jistě budou sílit, protože už nyní je hepcidin zkoumán i v řadě jiných oborů než jen v nefrologii či hematologii.

5 SEZNAM LITERATURY

- [1] Dunn, L.L. et al.: Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 17(2), 93–100 (2007).
- [2] Aisen, P. et al.: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33(10), 940–959 (2001).
- [3] Ganz, T.: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 102(3), 783–788 (2003).
- [4] Swinkels, D.W. et al.: Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin. Chem.* 52(6), 950–968 (2006).
- [5] Hentze, M.W. et al.: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 117(3), 285–297 (2004).
- [6] Sharp, P., Srai, S. K.: Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J. Gastroenterol.* 13(35), 4716–4724 (2007).
- [7] Kemna, E.H.J.M. et al.: Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica.* 93(1), 90–97 (2008).
- [8] Frazer, D.M., Anderson, G.J.: Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289(4), G631–635 (2005).
- [9] Kohgo, Y. et al.: Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int. J. Hematol.* 88(1), 7–15 (2008).
- [10] Siah, C.W. et al.: Iron overload. *Clin. Chim. Acta.* 358(1-2), 24–36 (2005).
- [11] Graham, R.M. et al.: Liver iron transport. *World J. Gastroenterol.* 13(35), 4725–4736 (2007).
- [12] Neuwirtová, R., Poňka, P.: Železo - přítel, či nepřítel člověka? *Interní Med.* 12, 366–368 (2010).
- [13] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ferritin> (22.5.2013).
- [14] Finch, C.A. et al.: Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West. J. Med.* 145(5), 657–663 (1986).
- [15] MacKenzie, E.L. et al.: Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10(6), 997–1030 (2008).
- [16] Aisen, P. et al.: Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* 253(6), 1930–1937 (1978).
- [17] Beguin, Y.: Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin. Chim. Acta.* 329(1-2), 9–22 (2003).

- [18] Shih, Y.J. et al.: Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem.* 265(31), 19077–19081 (1990).
- [19] http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR98_sTfR.aspx (26.5.2013).
- [20] Zecca, L. et al.: Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(11), 863–873 (2004).
- [21] Krause, A. et al.: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480(2-3), 147–150 (2000).
- [22] Park, C.H. et al.: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276(11), 7806–7810 (2001).
- [23] Kemna, E.H.J.M. et al.: Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin. Chem.* 53(4), 620–628 (2007).
- [24] Ganz, T.: Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 18(2), 171–182 (2005).
- [25] Nemeth, E. et al.: The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.* 107(1), 328–333 (2006).
- [26] Rivera, S. et al.: Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood.* 106(6), 2196–2199 (2005).
- [27] Nicolas, G. et al.: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15), 8780–8785 (2001).
- [28] Nicolas, G. et al.: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(7), 4596–4601 (2002).
- [29] Ganz, T.: Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology.* 1, 29–35 (2006).
- [30] Nicolas, G. et al.: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110(7), 1037–1044 (2002).
- [31] Fleming, R.E., Sly, W.S.: Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15), 8160–8162 (2001).
- [32] Pigeon, C. 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.* 276(11), 7811–7819 (2001).
- [33] Nemeth, E. et al.: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306(5704), 2090–2093 (2004).

- [34] Njajou, O.T. et al.: Dominant hemochromatosis due to N144H mutation of SLC11A3: clinical and biological characteristics. *Blood Cells Mol. Dis.* 29(3), 439–443 (2002).
- [35] Peyssonnaud, C. et al.: TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood.* 107(9), 3727–3732 (2006).
- [36] Merle, U. et al.: The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology.* 148(6), 2663–2668 (2007).
- [37] Bekri, S. et al.: Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology.* 131(3), 788–796 (2006).
- [38] Dallalio, G. et al.: Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood.* 107(7), 2702–2704 (2006).
- [39] Gangaidzo, I.T. et al.: Association of pulmonary tuberculosis with increased dietary iron. *J. Infect. Dis.* 184(7), 936–939 (2001).
- [40] Marx, J.J.M.: Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 15(2), 411–426 (2002).
- [41] Singh, B. et al.: Hepcidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin. Chim. Acta.* 412(11-12), 823–830 (2011).
- [42] Zwilling, B.S. et al.: Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.* 67(3), 1386–1392 (1999).
- [43] Shi, Y., Massagué, J.: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113(6), 685–700 (2003).
- [44] Babitt, J.L., Lin, H.Y.: Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am. J. Kidney Dis.* 55(4), 726–741 (2010).
- [45] Pietrangelo, A. et al.: STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology.* 132(1), 294–300 (2007).
- [46] Wrighting, D.M., Andrews, N.C.: Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 108(9), 3204–3209 (2006).
- [47] Lee, P. et al.: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(6), 1906–1910 (2005).
- [48] Peyssonnaud, C. et al.: Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle.* 7(1), 28–32 (2008).
- [49] Peyssonnaud, C. et al.: Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* 117(7), 1926–1932 (2007).
- [50] Weiss, G., Goodnough, L.T.: Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352(10), 1011–1023 (2005).
- [51] Laftah, A.H. et al.: Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood.* 103(10), 3940–3944 (2004).

- [52] Weinstein, D.A. et al.: Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 100(10), 3776–3781 (2002).
- [53] Lyon, E., Frank, E.L.: Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin. Chem.* 47(7), 1147–1156 (2001).
- [54] Nemeth, E. et al.: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 113(9), 1271–1276 (2004).
- [55] Nuding, S. et al.: Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*. 56(9), 1240–1247 (2007).
- [56] Arnold, J. et al.: Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21(4), 425–429 (2009).
- [57] Bergamaschi, G. et al.: Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica*. 95(2), 199–205 (2010).
- [58] Kemna, E.H.J.M. et al.: Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol. Dis.* 40(3), 339–346 (2008).
- [59] Roe, M.A. et al.: Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. *Br. J. Nutr.* 97(3), 544–549 (2007).
- [60] Malyszko, J. et al.: Hepcidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am. J. Hematol.* 81(11), 832–837 (2006).
- [61] Cibulka, R., Racek, J.: Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *Physiol. Res.* 56(6), 697–705 (2007).
- [62] Dayer, J.M., Choy, E.: Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 49(1), 15–24 (2010).
- [63] Sullivan, J.L.: Stored iron and vascular reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(8), 1532–1535 (2005).
- [64] Kraml, P.J. et al.: Iron loading increases cholesterol accumulation and macrophage scavenger receptor I expression in THP-1 mononuclear phagocytes. *Metab. Clin. Exp.* 54(4), 453–459 (2005).
- [65] Minqin, R. et al.: The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radic. Biol. Med.* 38(9), 1206–1211 (2005).
- [66] Sasu, B.J. et al.: Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol. Dis.* 45(3), 238–245 (2010).

- [67] Vermeulen, E., Vermeersch, P.: Hepcidin as a Biomarker for the Diagnosis of Iron Metabolism Disorders: A Review. *Acta Clin. Belg.* 67(3), 190–7 (2012).
- [68] Kemna, E. et al.: Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood.* 106(9), 3268–3270 (2005).
- [69] Murphy, A.T. et al.: Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood.* 110(3), 1048–1054 (2007).
- [70] Ganz, T. et al.: Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 112(10), 4292–4297 (2008).
- [71] Grebenchtchikov, N. et al.: High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin. *Br. J. Haematol.* 146(3), 317–325 (2009).
- [72] Butterfield, A.M. et al.: A dual-monoclonal sandwich ELISA specific for hepcidin-25. *Clin. Chem.* 56(11), 1725–1732 (2010).
- [73] Li, H. et al.: Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 59(3), 171–180 (2009).
- [74] Swinkels, D.W. et al.: Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE.* 3(7), e2706 (2008).
- [75] Sasu, B.J. et al.: Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood.* 115(17), 3616–3624 (2010).
- [76] <http://lilly.com/SiteCollectionDocuments/Pipeline/Clinical%20Development%20Pipeline/index.html#PhaseI>. (14.6.2013)
- [77] <http://www.pieris-ag.com/pipeline/prs-080.php> (15.6.2013)
- [78] Pendergrast, P.S. et al.: Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J. Biomol. Tech.* 16(3), 224–234 (2005).
- [79] Yu, P.B. et al.: Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* 4(1), 33–41 (2008).
- [80] Babitt, J.L. et al.: Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J. Clin. Invest.* 117(7), 1933–1939 (2007).
- [81] Andriopoulos, B., Jr et al.: BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* 41(4), 482–487 (2009).
- [82] Poli, M. et al.: Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood.* 117(3), 997–1004 (2011).
- [83] Ohtake, T. et al.: Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31(1 Suppl), S2–8 (2007).
- [84] Harrison-Findik, D.D.: Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J. Gastroenterol.* 15(10), 1186–1193 (2009).

- [85] Song, S.N.J. et al.: Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood*. 116(18), 3627–3634 (2010).
- [86] Perlstein, T.S. et al.: Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in subgroups of elderly persons with anemia: association with anemia of inflammation. *Blood*. 117(10), 2800–2806 (2011).
- [87] Saab, G. et al.: Prevalence of vitamin D deficiency and the safety and effectiveness of monthly ergocalciferol in hemodialysis patients. *Nephron Clin. Pract.* 105(3), c132–138 (2007).
- [88] Kumar, V.A. et al.: Vitamin D supplementation and recombinant human erythropoietin utilization in vitamin D-deficient hemodialysis patients. *J. Nephrol.* 24(1), 98–105 (2011).
- [89] Lac, P.T. et al.: The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. *Clin. Nephrol.* 74(1), 25–32 (2010).
- [90] Fernandes, A. et al.: The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*. 114(2), 437–443 (2009).
- [91] Sun, C.C. et al.: Targeting the Hepcidin-Ferroportin Axis to Develop New Treatment Strategies for Anemia of Chronic Disease and Anemia of Inflammation. *Am. J. Hematol.* 87(4), 392–400 (2012).
- [92] Cibulka, R., Racek, J.: Metabolic Complications of Chronic Kidney Failure and Hemodialysis. *Special Problems in Hemodialysis Patients*. InTech (2011).
- [93] Ashby, D.R. et al.: Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 75(9), 976–981 (2009).
- [94] Kroot, J.J.C. et al.: (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies. *Anal. Biochem.* 389(2), 124–129 (2009).
- [95] Cherayil, B.J.: Cross-talk between iron homeostasis and intestinal inflammation. *Gut Microbes.* 1(1), 65–69 (2010).
- [96] Ford, B.A. et al.: Intra-individual variability in serum hepcidin precludes its use as a marker of iron status in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 78(8), 769–773 (2010).
- [97] Peters, H.P.E. et al.: Intra-individual variability of serum hepcidin-25 in haemodialysis patients using mass spectrometry and ELISA. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27(10), 3923–3929 (2012).
- [98] Hamilton, L.D. et al.: Diurnal variation in the plasma iron level of man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75(1), 65–68 (1950).
- [99] Høyer, K.: Physiologic Variations in the Iron Content of human Blood Serum. *Acta Med. Scand.* 119(6), 562–576 (1944).

- [100] Statland, B.E. et al.: Variation of serum iron concentration in young healthy men: Within-day and day-to-day changes. *Clin. Biochem.* 9(1), 26–29 (1976).
- [101] Wiltink, W.F. et al.: Diurnal and nocturnal variations of the serum iron in normal subjects. *Clin. Chim. Acta.* 49(1), 99–104 (1973).
- [102] Bowie, E.J. et al.: Daily variation in the concentration of iron in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 40, 491–494 (1963).
- [103] Koch, B.C.P. et al.: Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 5(7), 407–416 (2009).
- [104] Campostrini, N. et al.: Evaluation of hepcidin isoforms in hemodialysis patients by a proteomic approach based on SELDI-TOF MS. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010).
- [105] Kuragano, T. et al.: Determinants of hepcidin in patients on maintenance hemodialysis: role of inflammation. *Am. J. Nephrol.* 31(6), 534–540 (2010).
- [106] Weiss, G. et al.: Serum hepcidin concentration in chronic haemodialysis patients: associations and effects of dialysis, iron and erythropoietin therapy. *Eur. J. Clin. Invest.* 39(10), 883–890 (2009).
- [107] Zaritsky, J. et al.: Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5(6), 1010–1014 (2010).
- [108] Tomosugi, N. et al.: Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood.* 108(4), 1381–1387 (2006).
- [109] Malyszko, J. et al.: Type of renal replacement therapy and residual renal function may affect prohepcidin and hepcidin. *Ren. Fail.* 31(10), 876–883 (2009).
- [110] Van der Weerd, N.C. et al.: Hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients is related to residual kidney function and not to treatment with erythropoiesis stimulating agents. *PLoS ONE.* 7(7), e39783 (2012).
- [111] Xu, Y. et al.: Serum hepcidin in haemodialysis patients: associations with iron status and microinflammation. *J. Int. Med. Res.* 39(5), 1961–1967 (2011).
- [112] Basseri, R.J. et al.: Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* (2012).
- [113] Eiselt, J. et al.: High ferritin, but not hepcidin, is associated with a poor immune response to an influenza vaccine in hemodialysis patients. *Nephron Clin. Pract.* 115(2), c147–153 (2010).
- [114] Jindal, R.M., Zawada Jr, E.T.: Obesity and kidney transplantation. *Am. J. Kidney Dis.* 43(6), 943–952 (2004).
- [115] Teplan, V. et al.: Asymmetric Dimethylarginine in Obesity After Renal Transplantation. *J. Ren. Nutr.* 18(6), 513–520 (2008).
- [116] Vokurka, M. et al.: Hepcidin expression in adipose tissue increases during cardiac surgery. *Physiol. Res.* 59(3), 393–400 (2010).

- [117] Sarafidis, P.A. et al.: Obesity and iron deficiency in chronic kidney disease: the putative role of hepcidin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27(1), 50–57 (2012).
- [118] Papillard-Marechal, S. et al.: Iron metabolism in patients with anorexia nervosa: elevated serum hepcidin concentrations in the absence of inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 95(3), 548–554 (2012).
- [119] Suzuki, H. et al.: Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J. Exp. Med.* 218(2), 93–98 (2009).
- [120] Kobold, U. et al.: Quantification of hepcidin-25 in human serum by isotope dilution micro-HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 54(9), 1584–1586 (2008).
- [121] Koliaraki, V. et al.: A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS ONE.* 4(2), e4581 (2009).
- [122] Gözdemir, E. et al.: Is hepcidin a new cardiovascular risk marker in polycystic ovary syndrome? *Gynecol. Obstet. Invest.* 75(3), 196–202 (2013).
- [123] Pardanani, A. et al.: Associations and prognostic interactions between circulating levels of hepcidin, ferritin and inflammatory cytokines in primary myelofibrosis. *Am. J. Hematol.* 88(4), 312–316 (2013).
- [124] Gifford, A.H. et al.: Iron homeostasis during cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *Clin. Transl. Sci.* 5(4), 368–373 (2012).
- [125] Wu, T.-W. et al.: The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J. Pediatr.* 162(1), 67–71 (2013).
- [126] Tan, T.C.H. et al.: The serum hepcidin:ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver Int.* 32(9), 1391–1399 (2012).

6 SEZNAM ZKRATEK

ACD	anemia of chronic disease
AI	anemia of inflammation
ANOVA	analysis of variance
BMP	bone morphogenetic protein
CIT	cold ischemia time
CKD	chronic kidney disease
CREBH	cyclic AMP response element-binding protein H
CRP	C-reactive protein
DcytB	duodenal cytochrom b-like ferrireductase
DMT	divalent metal transporter
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESA	erythropoiesis stimulating agents
FPN	ferroportin
FSGS	focal segmental glomerulosclerosis
HCP1	heme carrier protein
HFE	hemochromatosis protein
HH	hereditary hemochromatosis
HIF	hypoxia inducing factor
HJV	hemojuvelin
HLA	human leukocyte antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
HRE	hypoxia responsive element
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
IFN	interferon
IL	interleukin
IREs	iron responsive elements
IRIDA	iron-refractory iron deficiency anemia
IRPs	iron responsive proteins
JAK	Janus kinase
KDOQ/I	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
LC	liquid chromatography
LEAP	liver expressed antimicrobial peptide
MDRD	modification of diet in renal disease

MHC	major histocompatibility complex
NRAMP	natural-resistance-associated macrophage protein
NTBI	non-transferrin bound iron
PRA	panel of reactive antibodies
RNAi	RNA interference
RPGN	rapidly progressive glomerulonephritis
SELDI-TOF/MS	surface-enhanced laser desorption/ionization - time-of-flight/mass spectrometry
shRNA	short hairpin RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
sTfR	soluble transferrin receptor
TfR	transferrin receptor
TGF	transforming growth factor
TMPRSS6	transmembrane protease, serin 6
TNF	tumor necrosis factor
Usf2	Upstream factor 2
UTR	untranslated region