

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

Ing. Terezie Sedláčková

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

Pizeň 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: 04 – Biochemie a patobiochemie,

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav klinické biochemie a hematologie LF UK a FN v Plzni

Autor: ing. Terezie Sedláčková

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Oponenti: Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
Prof. MUDr. Vladimír Teplan, DrSc.

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne v hod.

OBSAH

1	SOUHRN.....	1
2	SUMMARY.....	2
3	ÚVOD.....	3
4	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	4
5	MATERIÁL A METODIKA	5
5.1	Pilotní studie Hepcidin u hemodialyzovaných pacientů	5
5.1.1	Pacienti.....	5
5.1.2	Kontroly	5
5.1.3	Biochemická měření	5
5.1.4	Statistika.....	5
5.2	Studie Hepcidin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů.....	6
5.2.1	Pacienti.....	6
5.2.2	Kontroly	6
5.2.3	Biochemická měření	6
5.2.4	Statistika.....	7
5.3	Studie Hepcidin u pacientů po transplantaci ledviny	7
5.3.1	Design studie.....	7
5.3.2	Pacienti.....	7
5.3.3	Odběr biologického materiálu a provedená stanovení	8
5.3.4	Statistika.....	8
6	VÝSLEDKY	9
6.1	Výsledky pilotní studie	9
6.2	Výsledky studie Hepcidin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů	9
6.3	Výsledky studie Hepcidin u pacientů po transplantaci ledviny	12
6.3.1	Statistická deskripce, vývoj v čase, změna mezi časem 1 – 4 a grafy vývoje jednotlivých analytů	12
6.3.2	Korelace parametrů metabolismu železa s parametry zánětu, funkce ledvin a ukazatele krvetvorby v jednotlivých časech	15

6.3.3	Repeated ANOVA.....	17
7	<i>DISKUSE</i>	19
8	<i>ZÁVĚR</i>	24
9	<i>SEZNAM LITERATURY</i>	25
10	<i>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI</i>	28
11	<i>PODĚKOVÁNÍ</i>	31

1 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. Expresce 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.

2 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.

3 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 mocnostvích, 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 erythropoesu, 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 Element), 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 hepcidinu je molekula ferroportinu-jediného dosud známého exportéru železa z buňky; 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.

4 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

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 erythropoesy 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 podstatnělepší 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.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Pilotní studie Hepcidin u hemodialyzovaných pacientů

5.1.1 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.

5.1.2 Kontroly

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

5.1.3 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.

5.1.4 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.

5.2 Studie Hepcidin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů

5.2.1 Pacienti

Do této studie bylo zařazeno 178 pacientů z programů chronické dialýzy ve Fakultní nemocnici v Plzni a v dialyzačním středisku BBraun 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 započátkem studie žádné železo i.v.

5.2.2 Kontroly

Sledovali jsme také 40 zjevně zdravých kontrolních dobrovolných jedinců s normální funkcí ledvin (hladina kreatininu pod 100 $\mu\text{mol/l}$), 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.

5.2.3 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.

5.2.4 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.

5.3 Studie Hecpidin u pacientů po transplantaci ledviny

5.3.1 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 popsané 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.

5.3.2 Pacienti

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, nejdélší 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 kadaverózní ledvina. V 59 případech šlo u pacientů o první transplantaci, v 11 případech o druhou transplantaci a u jedné pacientky šlo o třetí transplantaci.

Opožděnou funkci štěpu, tj. nutnost dialýzy i po transplantaci, mělo 34 pacientů ze 71. 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 $\mu\text{mol/l}$.

5.3.3 Odběr biologického materiálu a provedená stanovení

Odběr biologického materiálu byl proveden podle platných doporučení do odběrového systému Vacuette. V centrálních laboratořích IKEM 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 zamrazeny. 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 výrobcem jednotlivých souprav. Hecpidin 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.

5.3.4 Statistika

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.

6 VÝSLEDKY

6.1 Výsledky pilotní studie

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: 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 ($r=-0,425$, $p=0,0063$) a CRP ($r=-0,476$, $p=0,0019$), ferritin negativně koreloval s transferrinem ($r=-0,383$, $p=0,0147$), transferrin pozitivně koreloval se sTfR ($r=0,33$, $p=0,0374$) a hepcidin významně pozitivně koreloval se železem ($r=0,339$, $p=0,0321$) a saturací železa ($r=0,421$, $p=0,0076$) a negativně s transferrinem ($r=-0,399$, $p=0,0107$) a se sTfR ($r=-0,369$, $p=0,0076$).

6.2 Výsledky studie Heparin a ferritin u hemodialyzovaných pacientů

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. 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. 2: Deskriptivní statistika skupiny dialyzovaných pacientů i jejich podskupin a kontrolní skupiny

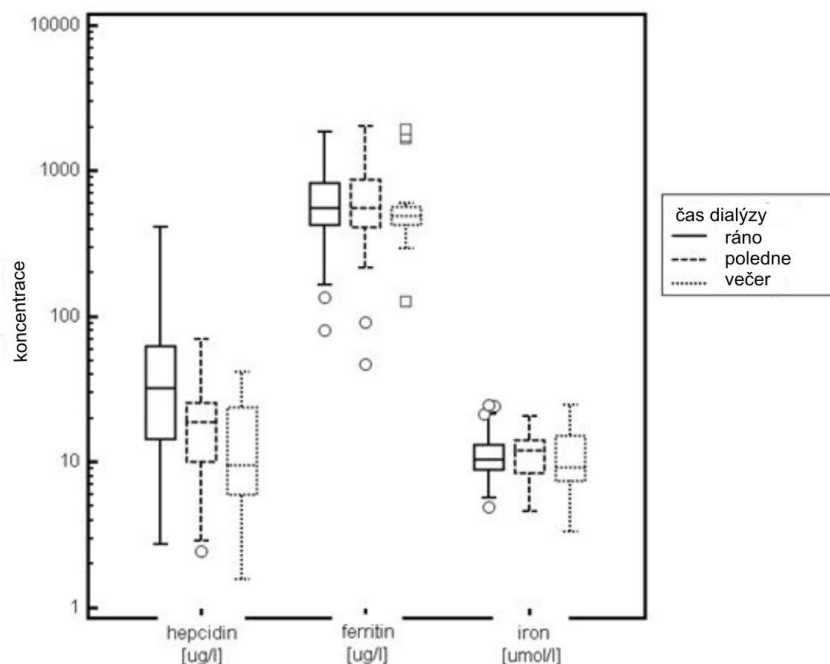
	DIALYZOVANÍ PACIENTI			KONTROLY (n = 37)	p-value***	
	VŠICHNI (n = 164)	PODLE ČASU DIALÝZY				
		Ráno (n = 79)	poledne (n = 64)			večer (n = 21)
Hemoglobin (g/l)	112* 104 - 121**	112 104 - 121	113 107 - 122	109 103 - 116	139 133 - 148	p<0,0001
hepcidin (µg/l)	21,2 9,8 - 36,9	32,1 14,5 - 62,2	18,8 10,1 - 25,7	9,6 6,0 - 23,9	10,4 7,5 - 17,5	p=0,0003
IL-6 (ng/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 [1, 2], 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. 1).



Obr. 1: Diurnální variabilita hepcidinu, ferritinu a železa. Vyjádřeno ve formě krabicových grafů.

Ve skupině pacientů i v podskupinách byly provedeny neparametrické korelace. Ty ukázaly slabé až velmi slabé, avšak statisticky významné korelace mezi parametry metabolismu železa a zánětu v celé skupině pacientů. Železo pozitivně korelovalo s ferritinem ($r=0,31$, $p=0,0001$) a negativně se sTfR ($r=-0,42$, $p<0,0001$), CRP ($r=-0,37$, $p<0,0001$) a IL-6 ($r=-0,25$, $p=0,001$). Ferritin pozitivně koreloval s IL-6 ($r=0,18$, $p=0,02$) a hepcidinem ($r=0,13$, $p=0,02$) a negativně se sTfR ($r=-0,26$, $p=0,001$). Transferrin negativně koreloval s IL-6 ($r=-0,26$, $p=0,0006$). 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 ($r=0,32$, $p<0,01$) a záporně se sTfR ($r=-0,38$, $p<0,001$) a CRP ($r=-0,31$, $p=0,005$), ferritin pozitivně koreloval s hepcidinem ($r=0,28$, $p=0,01$) a záporně s transferrinem ($r=-0,34$, $p<0,01$) a IL-6 pozitivně koreloval s CRP ($r=0,37$, $p<0,005$) a záporně s transferrinem ($r=-0,35$, $p<0,005$).

V podskupině pacientů, kteří prodělali hemodialýzu v poledne, korelovalo železo záporně s CRP ($r=-0,49$, $p<0,0001$), IL-6 ($r=-0,3$, $p=0,01$) a sTfR ($r=-0,26$, $p<0,05$), ferritin koreloval pozitivně s IL-6 ($r=0,36$, $p<0,005$) a sTfR ($r=-0,42$, $p=0,0005$) a negativně s transferrinem ($r=-0,34$, $p<0,01$) a IL-6 pozitivně koreloval s CRP ($r=0,34$, $p<0,01$).

V podskupině pacientů, kteří byli dialyzováni večer, železo pozitivně korelovalo s ferritinem ($r=0,49$, $p<0,05$) a negativně se sTfR ($r=-0,7$, $p<0,001$), ferritin negativně koreloval se sTfR ($r=-0,53$, $p<0,05$) a CRP pozitivně koreloval s IL-6 ($r=0,62$, $p<0,005$) a také s hepcidinem ($r=0,59$, $p<0,005$). 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.

6.3 Výsledky studie Hepcidin u pacientů po transplantaci ledviny

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

Statistická deskripce hladin měřených parametrů v jednotlivých časech je uvedena v tabulce 3.

Tab. 3: Statistická deskripce hladin měřených parametrů v jednotlivých časech

	číslo odběru					
	0 n=71	1 n=71	2 n=71	3 n=71	4 n=71	5 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 [ng/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 [ng/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

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.

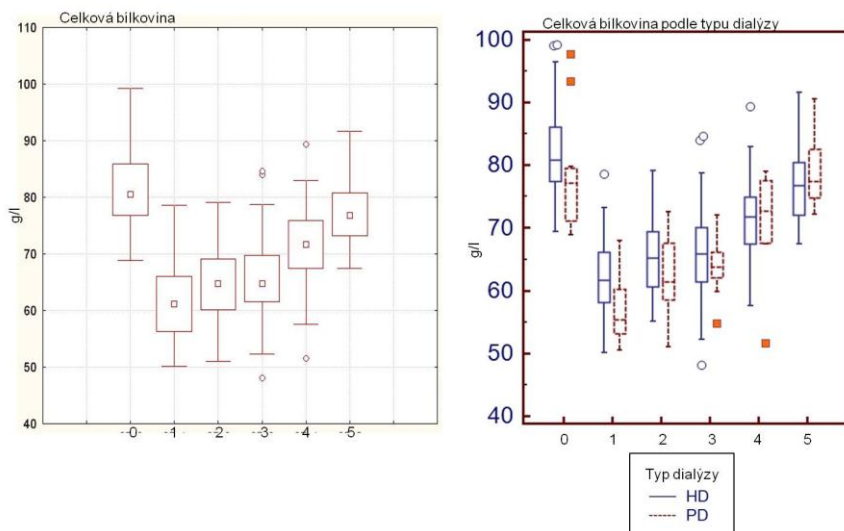
Změny v počtu erythrocytů, hladinách hemoglobinu, v hematokritu i ve středním objemu erythrocytů byly mezi jednotlivými časovými obdobími významné ($p < 0.000001$). Zejména v období po transplantaci došlo k velkému poklesu počtu erythrocytů, hemoglobinu i hematokritu v důsledku krevních ztrát při výkonu 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 ($p < 0,0001$).

Změny v hladinách CRP a IL-6 mezi jednotlivými časovými obdobími byly 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.

Změny v hladinách celkové bílkoviny byly 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 Obr. 2, 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. 2: Trend celkové bílkoviny v čase (vlevo) a trend celkové bílkoviny v čase podle typu dialýzy (vpravo)

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.

6.3.2 Korelace parametrů metabolismu železa s parametry zánětu, funkce ledvin a ukazatele krvetvorby v jednotlivých časech

V čase 0, tedy v čase před transplantací ledviny, silně významně korelovalo železo se saturací ($r=0,92475$, $p < 0,0001$), slabá korelace byla mezi železem a ferritinem ($r=0,335$, $p=0,0043$) a železem a hepcidinem ($r=0,2465$, $p=0,0382$). Negativní středně silná významná závislost byla prokázána mezi železem a sTfR ($r=-0,53676$, $p < 0,0001$). Transferrin koreloval se saturací ($r=-0,44101$, $p=0,0001$), cystatinem c ($r=-0,37015$, $p=0,0015$), interleukinem-6 ($r=-0,33735$, $p=0,004$), ferritinem ($r=-0,32903$, $p=0,0051$), CRP ($r=-0,23469$, $p=0,0488$) a s hemoglobinem ($r=0,25484$, $p=0,032$). Solubilní transferrinové receptory korelovaly negativně se saturací ($r=-0,52512$, $p < 0,0001$) a slabě pozitivně s hemoglobinem ($r=0,26351$, $p=0,0264$), CRP ($r=0,26367$, $p=0,0263$) a interleukinem-6 ($r=0,24789$,

p=0,0371). Ferritin významně pozitivně koreloval se saturací ($r=0,4186$, $p=0,0003$) a negativně s kreatininem ($r=-0,29099$, $p=0,0138$) a hepcidin slabě pozitivně koreloval se saturací ($r=0,25712$, $p=0,0304$).

V čase 1, tj. v brzkém čase po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací ($r=0,91905$, $p < 0,0001$) a negativně se sTfR ($r=-0,34923$, $p=0,0028$), CRP ($r=-0,43782$, $p=0,0001$) a interleukinem-6 ($r=-0,28667$, $p=0,0154$). Transferrin negativně koreloval se saturací ($r=-0,36962$, $p=0,0015$) a CRP ($r=-0,2417$, $p=0,0423$) a pozitivně se sTfR ($r=0,32761$, $p=0,0053$). Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací ($r=-0,40379$, $p=0,0005$) a pozitivně s hemoglobinem ($r=0,30429$, $p=0,0099$), CRP ($r=0,293$, $p=0,0131$) a interleukinem-6 ($r=0,26355$, $p=0,0264$). Ferritin pozitivně koreloval se saturací ($r=0,2275$, $p=0,0564$) a CRP ($r=0,26412$, $p=0,026$) a negativně s transferrinem ($r=-0,29579$, $p=0,0123$). Hemoglobin negativně koreloval se saturací ($r=0,31696$, $p=0,0071$) a pozitivně s CRP ($r=0,30879$, $p=0,0088$). Saturace negativně korelovala s CRP ($r=-0,32571$, $p=0,0056$).

V čase 2, tj. v čase 2 týdny po transplantaci pozitivně korelovalo železo se saturací ($r=0,89909$, $p=0,0001$) a ferritinem ($r=0,2485$, $p=0,0366$) a negativně se sTfR ($r=-0,4816$, $p=0,0001$) a CRP ($r=-0,2744$, $p=0,0206$). Transferrin negativně koreloval se saturací ($r=-0,441$, $p=0,0001$), CRP ($r=-0,43423$, $p=0,0002$), ferritinem ($r=-0,34663$, $p=0,0031$) a cystatinem c ($r=-0,26179$, $p=0,0274$). Ferritin pozitivně koreloval se saturací ($r=0,34619$, $p=0,0031$), interleukinem-6 ($r=0,32224$, $p=0,0061$) a CRP ($r=0,24153$, $p=0,0424$). Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací ($r=-0,51853$, $p < 0,0001$) a pozitivně s CRP ($r=0,3029$, $p=0,0102$), hemoglobin negativně koreloval s interleukinem-6 ($r=-0,29949$, $p=0,0112$) a cystatinem c ($r=-0,2435$, $p=0,0407$). Saturace pozitivně korelovala s cystatinem c ($r=0,25119$, $p=0,0346$) a hepcidin negativně koreloval s cystatinem c ($r=-0,23688$, $p=0,0467$).

V čase 3, tj. měsíc po transplantaci ledviny, korelovalo pozitivně železo se saturací ($r=0,88924$, $p < 0,0001$) a ferritinem ($r=0,30996$, $p=0,0085$) a negativně se sTfR ($r=-0,38457$, $p=0,0009$) a CRP ($r=-0,31679$, $p=0,0071$). Transferrin negativně koreloval s CRP ($r=-0,47695$, $p < 0,0001$), saturací ($r=-0,34908$, $p=0,0028$), interleukinem-6 ($r=-0,33376$, $p=0,0044$), ferritinem ($r=-0,28635$, $p=0,0155$) a cystatinem c ($r=-0,23934$, $p=0,0444$) a pozitivně se sTfR ($r=0,33991$, $p=0,0037$). Ferritin pozitivně koreloval s interleukinem-6 ($r=0,43151$, $p=0,0002$), saturací ($r=0,36773$, $p=0,0016$) a CRP ($r=0,33238$, $p=0,0046$). Hemoglobin negativně koreloval s kreatininem ($r=-0,30649$, $p=0,0093$), cystatinem c ($r=-0,29346$, $p=0,013$) a CRP ($r=-0,26008$, $p=0,0285$). Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací ($r=-0,49854$, $p < 0,0001$), cystatinem c ($r=-0,40244$, $p=0,0005$), kreatininem ($r=-0,34844$, $p=0,0029$) a pozitivně s hemoglobinem ($r=0,30887$, $p=0,0088$) a saturace pozitivně korelovala s cystatinem c ($r=0,26485$, $p=0,0256$).

V čase 4, tedy v čase 3 měsíce po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací ($r=0,85949$, $p<0,0001$) a negativně s CRP ($r=-0,4751$, $p<0,0001$), interleukinem-6 ($r=-0,4081$, $p=0,0004$) a sTfR ($r=-0,25594$, $p=0,0312$). Transferrin negativně koreloval s ferritinem ($r=-0,60499$, $p<0,0001$), saturací ($r=-0,42215$, $p=0,0002$), interleukinem-6 ($r=-0,29878$, $p=0,0114$) a CRP ($r=-0,28084$, $p=0,0177$) a pozitivně s hemoglobinem ($r=0,41645$, $p=0,0003$) a sTfR ($r=0,38287$, $p=0,001$). Ferritin pozitivně koreloval se saturací ($r=0,42867$, $p=0,0002$) a negativně se sTfR ($r=-0,27868$, $p=0,0186$). Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací ($r=-0,41418$, $p=0,0003$) a pozitivně s hemoglobinem ($r=0,2531$, $p=0,0332$). Hecpidin pozitivně koreloval s hemoglobinem ($r=0,28463$, $p=0,0161$) a negativně s kreatininem ($r=-0,28495$, $p=0,016$) a cystatinem c ($r=-0,2373$, $p=0,0463$). Saturace transferrinu negativně korelovala s CRP ($r=-0,32159$, $p=0,0062$) a interleukinem-6 ($r=-0,2588$, $p=0,0293$) a hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c ($r=-0,44733$, $p<0,0001$) a kreatininem ($r=-0,24737$, $p=0,0375$).

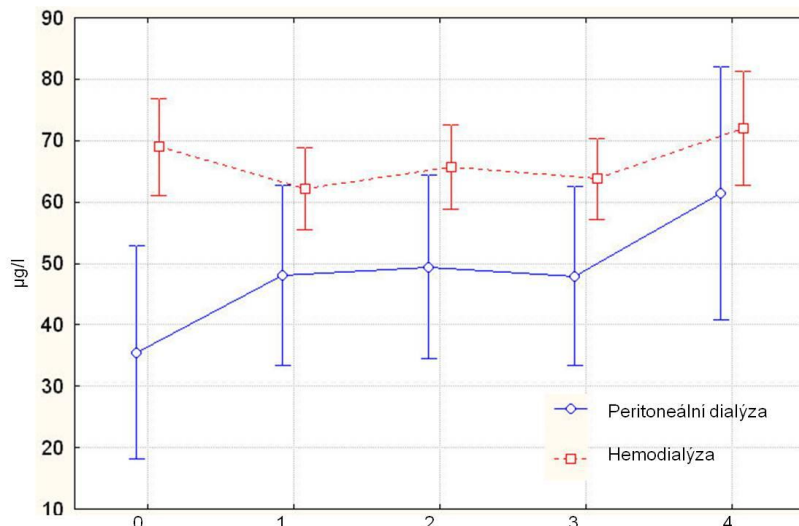
V čase 5, tedy v čase 6 měsíců po transplantaci, pozitivně korelovalo železo se saturací ($r=0,93915$, $p<0,0001$), ferritinem ($r=0,44104$, $p=0,0006$) a hemoglobinem ($r=0,39338$, $p=0,0025$) a negativně s CRP ($r=-0,53445$, $p<0,0001$), sTfR ($r=-0,46863$, $p=0,0002$) a interleukinem-6 ($r=-0,36904$, $p=0,0047$). Transferrin negativně koreloval s ferritinem ($r=-0,57175$, $p<0,0001$), interleukinem-6 ($r=-0,35042$, $p=0,0075$), cystatinem c ($r=-0,26667$, $p=0,049$) a saturací ($r=-0,26483$, $p=0,0465$) a pozitivně se sTfR ($r=0,30192$, $p=0,0225$) a hemoglobinem ($r=0,26822$, $p=0,0437$). Ferritin pozitivně koreloval se saturací ($r=0,59421$, $p<0,0001$) a negativně se sTfR ($r=-0,35938$, $p=0,006$). Solubilní transferrinové receptory negativně korelovaly se saturací ($r=-0,56166$, $p<0,0001$) a pozitivně s CRP ($r=0,32101$, $p=0,0149$) a interleukinem-6 ($r=0,28485$, $p=0,0317$). Hemoglobin negativně koreloval s cystatinem c ($r=-0,48998$, $p=0,0001$), CRP ($r=-0,32805$, $p=0,0127$), kreatininem ($r=-0,29811$, $p=0,0243$) a interleukinem-6 ($r=-0,27175$, $p=0,0409$) a pozitivně se saturací ($r=0,28988$, $p=0,0287$). Saturace negativně korelovala s CRP ($r=-0,49061$, $p=0,0001$) a interleukinem-6 ($r=-0,27616$, $p=0,0376$) a hepcidin negativně koreloval s kreatininem ($r=-0,2644$, $p=0,0376$).

6.3.3 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. 5. Náběr 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. 3), kde hepcidin byl v čase významně vyšší u hemodialyzovaných pacientů než u peritoneálně dialyzovaných pacientů ($p=0,0499$).



Obr. 3: Repeated ANOVA-trend hepcidinu ve skupině peritoneálně dialyzovaných pacientů a ve skupině hemodialyzovaných pacientů. Grafy jsou znázorněny jako průměr \pm 95% konfidenční interval.

7 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 [3], tím víc ale chybí pro erythropoesu. Odpovídající jsou i negativní korelace ferritinu s transferrinem a pozitivní korelace transferrinu se sTfR. Hepcidin 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 [4], 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 [5–7]. Všeobecně se předpokládá, že hladiny železa jsou vyšší v ranních hodinách než v hodinách pozdějších [8, 9], objevily se ale i studie, které ukázaly buď nejvyšší hladinu železa v odpoledních

hodinách [10, 11], nebo prokázaly významnou variabilitu během dne, ale bez systematického trendu [12]. U hepcidinu se předpokládá, že během dne koresponduje s hladinou železa [13]. 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 [14] 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. [1], 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% [2, 7], někde dokonce až 85% [6].

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 [1], další ukázaly pokles hepcidinu během dialýzy [15–18], někde dokonce s návratem hladiny hepcidinu na bazální hodnotu po 1 hodině [16] od ukončení dialýzy nebo setrvání na bazální hladině do příští dialýzy [17]; jinde došlo k poklesu hepcidinu jen u některých hemodialyzovaných pacientů [19]. 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 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 peritoneálně dialyzovaných a hemodialyzovaných pacientů se zachovanou reziduální funkcí ledvin byly hladiny hepcidinu významně nižší než u anurických pacientů [20, 21], 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 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.

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 [22]. 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 [23].

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 [24].

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 [25, 26]. Tuková tkáň také produkuje hepcidin jako odpověď na systémový zánět [27] i na zánět, probíhající přímo v ní [28]. Spekuluje se i o možné další regulaci hladiny hepcidinu, kterou má na svědomí stres způsobený malnutricí [29]. 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*) [30, 31]. 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. Hecpidin se naváže na ferroportin, čímž dojde k uzamčení dalšího železa v buňce [3].

Hecpidin 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 [32]. Byly však detekovány jak v moči, tak v séru [15, 30, 31]. Jak již bylo uvedeno výše, stanovení hepcidinu je poměrně komplikované. Nejprve byl hepcidin-25 identifikován v lidském séru metodou hmotnostní spektrometrie [30]. Pak byl izolován hepcidin-25 společně s hepcidinem-20 z moči metodou iontoměničové chromatografie a HPLC s reverzní fází [31]. 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 [33, 34], 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 [19]. Následovaly další metody stanovení - LC-MS/MS [35] či mikro-HPLC-MS/MS s izotopovou dilucí [36], 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 králíčí sérum [37]. 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 [38, 39]. Podobný rozdíl byl i mezi stanoveními metodou ELISA [13] a radioimunoanalytickým stanovením [1], – 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 [18] 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 [40] 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 třech 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.

8 ZÁVĚR

Během posledních deseti let došlo v důsledku objevení hepcidinu jako klíčového regulátoru metabolismu železa k velkému posunu ve znalostech o metabolismu železa. Heparin 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 ledvin léčené hemodialýzou nebo transplantací ledviny. 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 ledvin, u kterých je známo, že trpí anémií, způsobenou celou řadou příčin.

Naše výsledky ukázaly, že hodnocení stavu metabolismu železa u pacientů s terminálním onemocněním ledvin 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.

9 SEZNAM LITERATURY

- [1] 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).
- [2] 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).
- [3] Cherayil, B.J.: Cross-talk between iron homeostasis and intestinal inflammation. *Gut Microbes.* 1(1), 65–69 (2010).
- [4] 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).
- [5] 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).
- [6] 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).
- [7] 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).
- [8] Hamilton, L.D. et al.: Diurnal variation in the plasma iron level of man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75(1), 65–68 (1950).
- [9] Høyer, K.: Physiologic Variations in the Iron Content of human Blood Serum. *Acta Med. Scand.* 119(6), 562–576 (1944).
- [10] 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).
- [11] Wiltink, W.F. et al.: Diurnal and nocturnal variations of the serum iron in normal subjects. *Clin. Chim. Acta.* 49(1), 99–104 (1973).
- [12] Bowie, E.J. et al.: Daily variation in the concentration of iron in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 40, 491–494 (1963).
- [13] Ganz, T. et al.: Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 112(10), 4292–4297 (2008).
- [14] Koch, B.C.P. et al.: Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 5(7), 407–416 (2009).
- [15] 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).

- [16] Kuragano, T. et al.: Determinants of hepcidin in patients on maintenance hemodialysis: role of inflammation. *Am. J. Nephrol.* 31(6), 534–540 (2010).
- [17] 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).
- [18] 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).
- [19] Tomosugi, N. et al.: Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood.* 108(4), 1381–1387 (2006).
- [20] 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).
- [21] 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), (2012).
- [22] Xu, Y. et al.: Serum hepcidin in haemodialysis patients: associations with iron status and microinflammation. *J. Int. Med. Res.* 39(5), 1961–1967 (2011).
- [23] Basseri, R.J. et al.: Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *J. Crohns Colitis*, (2012).
- [24] 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), 147–153 (2010).
- [25] Jindal, R. M., Zawada Jr, E.T.: Obesity and kidney transplantation. *Am. J. Kidney Dis.* 43(6), 943–952 (2004).
- [26] Teplan, V. et al.: Asymmetric Dimethylarginine in Obesity After Renal Transplantation. *J. Renal Nutr.* 18(6), 513–520 (2008).
- [27] Vokurka, M. et al.: Hepcidin expression in adipose tissue increases during cardiac surgery. *Physiol. Res.* 59(3), 393–400 (2010).
- [28] 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).
- [29] 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).
- [30] Krause, A. et al.: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480(2-3), 147–150 (2000).
- [31] Park, C.H. et al.: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276(11), 7806–7810 (2001).
- [32] 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).

- [33] Ganz, T.: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 102(3), 783–788 (2003).
- [34] Kemna, E. et al.: Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood*. 106(9), 3268–3270 (2005).
- [35] 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).
- [36] 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).
- [37] 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).
- [38] Nemeth, E. et al.: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 306 (5704), 2090–2093 (2004).
- [39] Swinkels, D.W. et al.: Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 3(7), e2706 (2008).
- [40] Koliaraki, V. et al.: A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS ONE*. 4(2), e4581 (2009).

10 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Články vztahující se k tématu

Sedláčková T., Racek J., Rajdl D., Kielberger L., Eiselt J., Malánová L., Babuška V. Relationship between hepcidin and ferritin in haemodialysed patients. Wien. Klin. Wochenschr. Podpořeno VZ MSM 0021620819. Přijato k tisku (IF 0,813)

Sedláčková T., Racek J., Eiselt J., Kielberger L., Malánová L.: Hepcidin and ferritin in hemodialyzed patients. Klin. Biochem. Metab., 19 (40), 2011, No. 4, p. 234 – 236.

Eiselt J., Kielberger L., Sedláčková T., Racek J., Pazdiora P.: High ferritin, but not hepcidin, is associated with a poor immune response to an influenza vaccine in hemodialysis patients. Nephron Clin. Pract. 115(2), 2010: 147-153 (podpořeno VZ MSM 0021620819) (IF 1,715)

Sedláčková T., Racek J. Metabolismus železa a jeho regulace. Klin. Biochem. Metab., 17 (38), 2009, No. 1, p. 17-23.

Ostatní články:

Vokurka S., Svoboda T., Rajdl D., Sedláčková T., Racek J., Koza V., Trefil L. Serum citrulline levels as a marker of enterocyte function in patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation - a pilot study. Med Sci Monit.19, 2013: 81-5.

Sedláčková T., Zídková J., Brázdová A., Melčová M., Škop V., Cibulka J., Ulčová-Gallová Z.: Protilátky proti spermiím. Chem. Listy 104, 2010: 3-6 (IF 0,62)

Abstrakta vztahující se k tématu

Sedláčková T., Racek J., Teplan V., Viklický O., Štěpánková J., Štollová M. Změny v metabolismu železa u pacientů po transplantaci ledviny. Klin Bioch Metab 2011 (3) P7

Sedláčková T., Racek J., Trefil L., Eiselt J., Kielberger L., Malánová L. Hepcidin and ferritin in hemodialyzed patients. NDT Plus (2011) 4 (suppl 2): doi:10.1093/ndtplus/4.s2.56

Ostatní abstrakta

Sedláčková T., Rajdl D., Trefil L., Racek J., Vokurka S., Svoboda T., Koza V. Citrullin - ukazatel masy funkčních enterocytů. Sborník abstraktů XXXIV. Imunoanalytických dnů a XIII. Czechtumy v Plzni, 14.-16. dubna 2013. (ISBN 978-80-263-0363-3)

Sedláčková T., Rajdl D., Trefil L., Racek J., Vokurka S., Svoboda T. Citrulline – marker of enterocytes mass and function in patients after stem cells transplantation. 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS and 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory medicine (CSMBLM): Laboratory Medicine at the Clinical Interface. *Biochemia Medica* 2012;22(3):A21-A204.

Sedláčková T., Rajdl D., Trefil L., Racek J., Vokurka S., Svoboda T., Koza V. Citrullin - ukazatel masy funkčních enterocytů. Sborník a program symposia FONS 2012 (ISBN 978-80-87436-01-1)

Přednášky vztahující se k tématu

Sedláčková, T., Racek, J., Teplan, V., Viklický, O., Štěpánková, J., Štollová, M.: Změny v metabolismu železa u pacientů po transplantaci ledviny. Sborník 51. studentské vědecké konference, Plzeň, 19. 5. 2011, s. 33 Sedláčková, T., Racek, J., Eiselt, J.: Souvislost mezi vysokým ferritinem a hepcidinem u hemodialyzovaných pacientů. 50. studentská vědecká konference LF UK v Plzni, 12. 5. 2010, Program a abstrakta. Podpořeno VZ MSM 0021620819.

Sedláčková T., Racek J.: Metabolismus železa. Přednáška na mezikrajském semináři pracovníků klinické biochemie a hematologie Plzeňského a Karlovarského kraje, Plzeň, březen 2009.

Racek, J., Sedláčková, T.: Regulace metabolismu železa. Program a sborník symposia klinické biochemie FONS 2008, Pardubice, 15. – 16. 9. 2008, s. 58

Ostatní přednášky

Sedláčková T., Rajdl D., Trefil L., Racek J., Vokurka S., Svoboda T., Koza V. Citrullin - ukazatel masy funkčních enterocytů. 52. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, 3.5.2012, Program a abstrakta.

Sedláčková T., Rajdl D., Trefil L., Racek J., Vokurka S., Svoboda T., Koza V. Citrullin - ukazatel masy funkčních enterocytů. Přednáška na mezikrajském semináři pracovníků klinické biochemie a hematologie Plzeňského a Karlovarského kraje, 7.3.2012, Klatovy

11 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 v Praze za sběr vzorků a dat, ing. Stanislavu Kormundovi za statistické zpracování části práce a mojí rodině za veškerou podporu.