Utjecaj sistemske upale na homeostazu željeza u egzacerbaciji i stabilnoj fazi kronične opstrukcijske plućne bolesti

Tandara, Leida

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:078764

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

LEIDA TANDARA

UTJECAJ SISTEMSKE UPALE NA HOMEOSTAZU ŽELJEZA U EGZACERBACIJI I STABILNOJ FAZI KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

LEIDA TANDARA

INFLUENCE OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON IRON HOMEOSTASIS DURING EXACERBATION AND STABILE CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

LEIDA TANDARA

UTJECAJ SISTEMSKE UPALE NA HOMEOSTAZU ŽELJEZA U EGZACERBACIJI I STABILNOJ FAZI KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Tihana Žanić Grubišić

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

LEIDA TANDARA

INFLUENCE OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON IRON HOMEOSTASIS DURING EXACERBATION AND STABILE CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Tihana Žanić Grubišić

Zagreb, 2016.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

ZAHVALJUJEM ...

mentorici prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić na nesebičnoj pomoći i podršci,

doc. dr. sc. Ilzi Salamunić na podršci i poticanju tijekom izrade doktorskog rada, ali i na mudrosti koju sam učila od nje tijekom desetak godina zajedničkog rada,

osoblju Klinike za plućne bolesti i Zavoda za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split i svim kolegicama koje su mi pomogle

i mojim najdražima jer ″vi ste bili svugdje u mom svemu″...

SAŽETAK

Glavni regulator sistemske homeostaze željeza je hepcidin, čiju sintezu reguliraju status željeza, upalni citokini, eritropoetska aktivnost, hipoksija i anemija. Cilj ovoga rada bio je ispitati povezanost između serumskog hepcidina i čimbenika koji ga reguliraju u skupini bolesnika s KOPB-om, da bi se ispitalo kako ovi čimbenici utječu na koncentraciju hepcidina i osiguravanje opskrbe željezom neophodnim za eritropoezu. Hipoteze istraživanja: koncentracija hepcidina u serumu bolesnika s KOPB-om promijenjena je u odnosu na kontrolnu skupinu i mijenja se tijekom egzacerbacije u odnosu na stabilnu fazu bolesti; na koncentraciju hepcidina u KOPB-u utječu upala i/ili hipoksija.

U istraživanje je bilo uključeno 40 bolesnika s KOPB-om bolesnika i 30 zdravih ispitanika. U KOPB skupini parametri su longitudinalno praćeni u tri vremenske točke: u egzacerbaciji, fazi rezolucije i stabilnoj fazi bolesti. Svim ispitanicima određena je koncentracija hepcidina, pokazatelja statusa željeza (serumsko željezo, TIBC, saturacija transferina, feritin); pokazatelja upale (broj leukocita i neutrofilnih granulocita, IL-6 i CRP), eritropoetske aktivnosti (broj retikulocita, topivi transferinski receptori i eritropoetin) i koncentracija hemoglobina. Svim bolesnicima s KOPB-om određeni su parcijalni tlak kisika i saturacija hemoglobina kisikom kao pokazatelji hipoksije.

Serumska koncentracija hepcidina bila je povišena u egzacerbaciji i stabilnoj fazi KOPB-a u odnosu na kontrolnu skupinu, te je pozitivno korelirala s IL-6 i CRP-om. Koncentracija hepcidina je bila pozitivno povezana s feritinom i negativno s TIBC-om. Eritropoetska aktivnost, mjerena apsolutnim brojem retikulocita bila je u svim fazama istraživanja niža od kontrolne skupine, a negativna povezanost je pokazana u egzacerbaciji. Koncentracija hepcidina nije bila povezana s parametrima hipoksije. U kontrolnoj skupini hepcidin je korelirao samo s pokazateljima statusa željeza, negativno s TIBC-om i pozitivno s feritinom.

Istraživanje je pokazalo da prisutna sistemska upala i povišena razina IL-6 u egzacerbaciji i stabilnoj fazi KOPB-a mogu biti odgovorne za opaženi porast koncentracije hepcidina. Porast koncentracije hepcidina mogao bi biti povezan s restriktivnom eritropoezom koja se očituje sniženim brojem retikulocita u svim fazama istraživanja, kao i snižavanju koncentracije hemoglobina u stabilnoj fazi bolesti. Dobiveni rezultati pružaju uvid u dinamičke promjene metabolizma željeza i povezanosti s razinom hepcidina. Sistemska upala

prisutna kod velikog broja bolesnika s KOPB-om jača kako bolest napreduje, te bi porast razine IL-6 mogao voditi do daljnjeg porasta koncentracije hepcidina.

Ključne riječi : hepcidin, COPD, interleukin-6, sistemska upala, metabolizam željeza

SUMMARY

Background: Hepcidin is the main regulator of systemic iron homeostasis, and its expression is modulated by iron status, hypoxia, erythroid factors and inflammation. The aim of this study was to examine a relationship between the level of hepcidin and iron status, erythropoietic activity, hypoxia, and inflammation in exacerbations, and stable COPD. We hypothesized that hepcidin concentration is changed compared to the control group and is also changing in acute exacerbation compared to stable COPD; hepcidin concentration is substantially influenced by inflammation and/or hypoxia.

Methods: The study included 40 COPD patients and 30 healthy subjects. In COPD group parameters were longitudinally monitored at three time points: at exacerbation, on resolution and in the stable disease. We determined concentration of hepcidin and hemoglobin; parameters of iron status: serum iron, total iron binding capacity (TIBC), ferritin, and calculated transferrin saturation. Soluble transferrin receptors, reticulocyte number (Rtc), and regulatory hormone erythropoietin were measured as indicators of erythropoietic activity. Systemic inflammation was assessed by determination of CRP, IL-6, and number of white blood cells and neutrophils. In COPD group partial oxygen pressure and haemoglobin oxygen saturation were determined.

Results: Hepcidin was elevated in exacerbations, and in the stable phase compared to the control group and we found positive correlations of hepcidin with inflammatory markers IL-6 and CRP. Hepcidin also correlated positively with ferritin, and inversely with TIBC. Erythropoietic activity, measured by absolute Rtc number, was significantly reduced in COPD compared to the control group in all study phases, and negative correlation with hepcidin was established in exacerbation. In the exacerbation and stable disease hepcidin correlated with ferritin and TIBC. No correlations were observed with indices of hypoxia. In the control group, positive associations were observed only with indices of iron status, positive with ferritin, and negative one with TIBC.

Conclusion: This study shows that elevated values of IL-6 present in exacerbations, and stabile COPD might be responsible for the observed increased hepcidin level. These might be associated with restricted erythropoiesis as shown by lower number of reticulocytes, and decreased level of haemoglobin at the stable phase. The results obtained might provide new insights into dynamic changes of iron metabolism, and its relation to hepcidin level in COPD. Systemic inflammation present in majority of COPD patients increases over time as disease progresses so raising of IL-6 level could lead to further up-regulation of hepcidin.

Keywords: hepcidin, COPD, interleukin-6, systemic inflammation, iron metabolism

1. UVOD

1.1. Homeostaza željeza 1

1.1.1. Uloga željeza u organizmu 1

1.1.2. Apsorpcija željeza 3

1.1.3. Transferin i transferinski ciklus 8

1.1.4. Rezervno željezo: feritin i hemosiderin 11

1.1.5. Sistemska homeostaza željeza 13

1.1.6. Hepcidin 15

1.1.7. Regulacija ekspresije hepcidina 19

1.1.8. Željezo i oksidacijski stres 25

1.2. Kronična opstrukcijska plućna bolest

1.2.1. Definicija KOPB-a 27

1.2.2. Patogeneza KOPB-a 28

1.2.3. Željezo i KOPB 30

1.2.4. Egzacerbacija KOPB-a 31

2. OBRAZLOŽENJE TEME 33

2.1. Cilj i hipoteze istraživanja 35

3. ISPITANICI I METODE 36

3.1. Plan istraživanja 36

3.2. Ispitanici 37

3.3. Metode 39

3.3.1. Biokemijski i hematološki parametri 39

3.3.2. Ostali postupci 40

3.4. Statistička analiza 41

4. REZULTATI 42

4.1. Longitudinalne vrijednosti hepcidina, pokazatelja upale, statusa željeza, pokazatelja eritropoetske aktivnosti i hemoglobina te hipoksije u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini 43

4.2. Povezanost između hepcidina i biokemijskih pokazatelja upale, statusa željeza, eritropoeze i hipoksije u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika s KOPB-om u tri vremenske točke 61

4.3. Longitudinalne vrijednosti pokazatelja oksidacijskog stresa i povezanost hepcidina s pokazateljima oksidacijskog stresa u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s KOPB-om..... 63

5. RASPRAVA 69

6. ZAKLJUČAK 77

7. LITERATURA 78

8. POPIS KRATICA 99

9. ŽIVOTOPIS 102

1.UVOD

1.1. HOMEOSTAZA ŽELJEZA

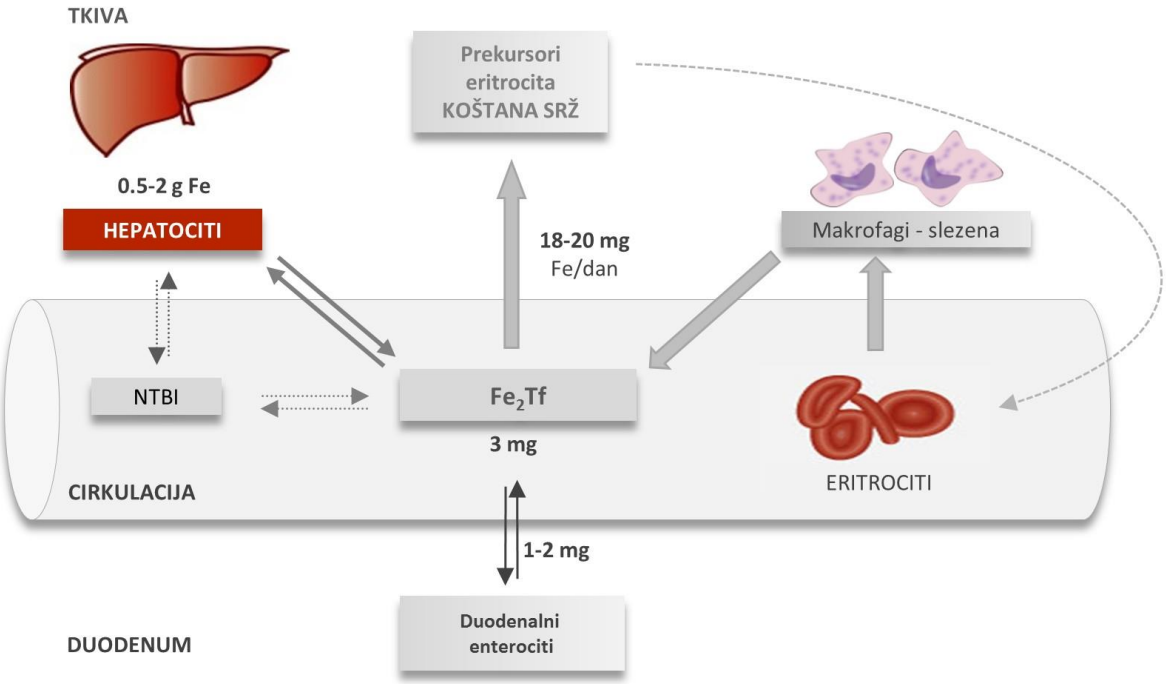
1.1.1. Uloga željeza u organizmu

Željezo je esencijalni element uključen u veliki broj biološki važnih reakcija koje se odvijaju u svakoj stanici. Važna je komponenta brojnih hemoproteina uključujući transportne proteine kisika i različite enzime (Tablica 1) (1-3). Tijelo odrasle osobe sadrži 3-5 g željeza (oko 45 mg/kg žene, oko 55 mg/kg muškarci). Najveći dio željeza (60-70 %) ugrađen je u hemoglobin cirkulirajućih eritrocita, a oko 20-30 % nalazi se u obliku feritina i hemosiderina u hepatocitima i makrofagima retikulo-endotelnog sustava (RES) kao rezervno željezo. Preostali dio željeza u tijelu nalazi se u mioglobinu u mišićima ili je ugrađen u različite stanične enzime (3). Za plazmatski transportni protein transferin vezano je 3 mg željeza, ali je ovaj transportni odjeljak vrlo dinamičan i izmjeni se oko deset puta u 24 sata (Slika 1).

Tablica 1. Proteini koji sadrže željezo.

PROTEINI KOJI SADRŽE ŽELJEZO
Hemoproteini koji transportiraju kisik (hemoglobin, mioglobin, neuroglobin)
Enzimi koji sadrže hem (citokromi, katalaza, peroksidaza, NO sintaza)
Enzimi koji sadrže Fe-S (akonitaza, ferokelataza)
Proteini koji sudjeluju u transportu željeza (transferin)
Proteini koji imaju ulogu u pohranjivanju željeza (feritin – citoplazmatski i mitohondrijski oblik, hemosiderin)

Najveće potrebe za željezom imaju eritroblasti u koštanoj srži, te se većina cirkulirajućeg željeza upotrebljava za sintezu hemoglobina u eritroblastima.



Slika 1. Distribucija željeza u organizmu. Tijelo odrasle osobe sadrži 3-5 g željeza. U hepatocitima i makrofagima RES-a kao rezervno željezo nalazi se 0,5-2 g željeza. Za sintezu hemoglobina dnevno se utroši 18-20 mg željeza. NTBI (engl. non transferrin bind iron), Tf (transferin).

Poremećaji homeostaze željeza ubrajaju se među najčešće bolesti ljudi (4). Iako je željezo četvrti element po zastupljenosti u zemljinoj kori, njegova je bioraspoloživost vrlo mala, te je unatoč niskim dnevnim potrebama nedostatak željeza najčešći nutricijski poremećaj u svijetu (5, 6). Na suprotnom kraju spektra poremećaja metabolizma željeza nalaze se poremećaji nakupljanja željeza koji predstavljaju heterogenu skupinu nasljednih i stečenih poremećaja. Hereditarna hemokromatoza česta je nasljedna metabolička bolest u sjevernoj Europi (7). Akumuliranje suvišnog željeza u organizmu vodi do oštećenja jetre, srca, gušterače i drugih organa. Osim sistemskih poremećaja homeostaze željeza u nekim bolestima važnu ulogu igra poremećaj homeostaze željeza na lokalnoj razini. Odlaganje suviška željeza u neuronima povezano je s pojavom nekih neurodegeneracijskih poremećaja poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, Friedrichove ataksije (8, 9). Nakupljanje željeza u mitohondrijima karakteristika je sideroblastičnih anemija, eritropoetske protoporfirije i sindroma mijelodisplazije (10). Nadalje, poremećeno recikliranje željeza posredovano jetrenim hormonom hepcidinom vodi do nastanka druge po učestalosti anemije – anemije kronične bolesti (AKB) (11).

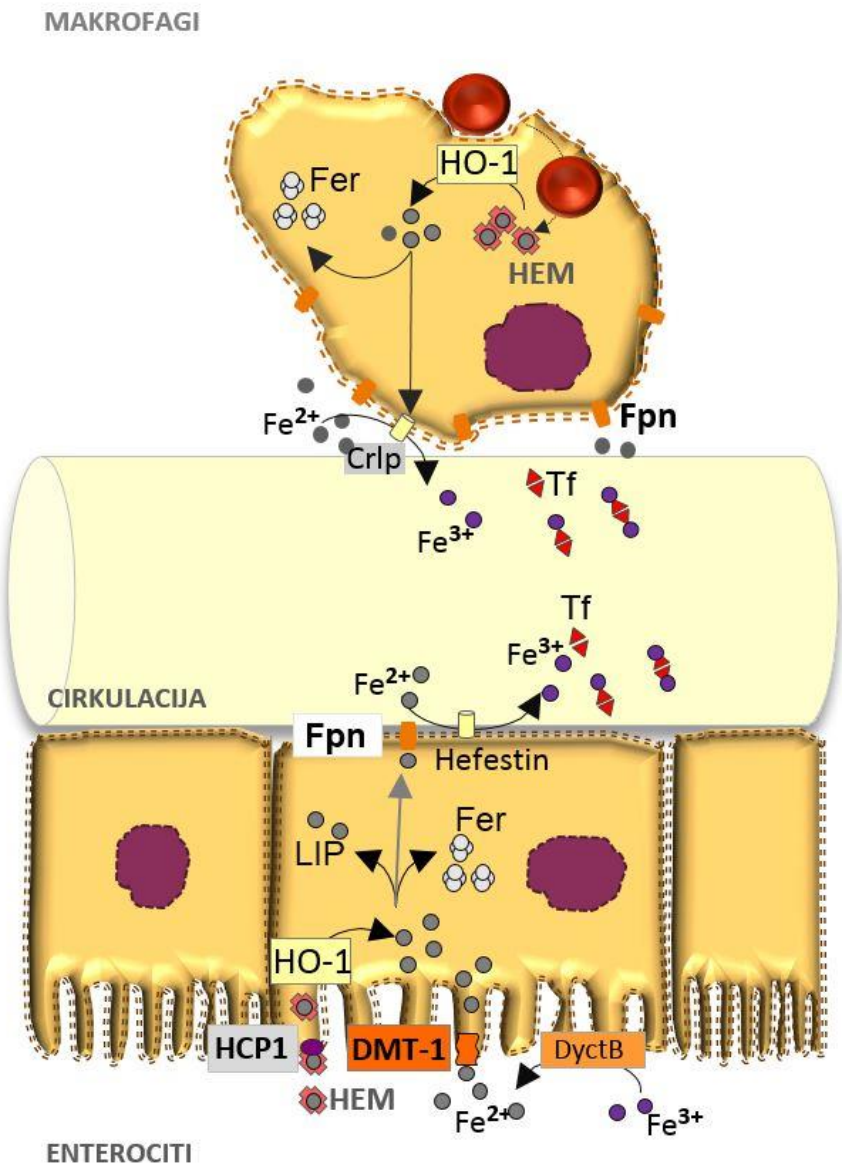
1.1.2. Apsorpcija željeza

Tijelo koristi željezo vrlo racionalno. Većinu dnevnih potreba za željezom osiguravaju makrofagi RES-a koji recikliraju 10-20 puta veću količinu željeza od one koja se apsorbira u crijevima. Željezo se iz organizma gubi ljuštenjem epitelnih stanica kože te stanica crijevnog epitela. Muškarci gube oko 1 mg željeza dnevno, dok žene tijekom reprodukcijske dobi gube dvostruku količinu željeza zbog menstrualnog krvarenja. Kod zdravih ljudi u crijevima se apsorbira 1-2 mg željeza na dan čime se kompenzira dnevni gubitak. Zahtjevi tijela za željezom rastu tijekom adolescencije zbog naglog rasta kao i tijekom trudnoće zbog povećavanja volumena krvi i zahtjeva fetusa (12). Optimalni dnevni unos željeza prehranom je oko 8-10 mg.

Apsorpcija željeza se odvija u duodenumu i donjem dijelu jejunuma i predstavlja kompleksan proces koji uključuje niz membranskih proteina koji transportiraju željezo kroz apikalnu membranu enterocita, proteine koji transportiraju željezo preko bazolateralne membrane enterocita te proteine koji mijenjaju redoks stanje željeza i tako sudjeluju u transportu (Tablica 2; Slika 2).

Tablica 2. Proteini koji sudjeluju u apsorpciji željeza ili mijenjaju redoks stanje željeza.

PROTEINI UKLJUČENI U APSORPCIJU ŽELJEZA
Transporter dvovalentnih metala 1 (eng. divalent metal transporter 1, DMT-1) - posreduje u transportu dvovalentnih metalnih kationa na apikalnoj membrani duodenalnih enterocita i membrani endosoma (13, 14)
Feroportin – posreduje u transportu dvovalentnog željeza iz stanice (15, 16)
HCP1 (engl. heme-carrier protein 1) - omogućuje apsorpciju hemske skupine kroz apikalnu membranu enterocita (2, 17)
Integrin-mobilferin kompleks – posreduje u transportu trovalentnog željeza kroz apikalnu membranu duodenalnih enterocita (18, 19)
PROTEINI KOJI MIJENJAJU REDOKS STANJE ŽELJEZA
Duodenalni citokrom B (DyctB) – posreduje u redukciji trovalentnog željeza iz hrane na apikalnoj membrani duodenalnih enterocita (20, 21)
Ceruloplazmin – posreduje u oksidaciji dvovalentnog željeza prilikom otpuštanja iz stanice (22, 23)
Hefestin - membranski vezana feroksidaza, mijenja redoks stanje željeza prilikom transporta željeza kroz bazolateralnu membranu enterocita (24)
Hem oksigenaza 1 (HO-1) - katalizira otpuštanje željeza iz protoporfirinskog prstena tijekom razgradnje hema (25)



Slika 2. Apsorpcija željeza u crijevima i recikliranje željeza iz makrofaga retikulo-endotelnog sustava. Crlp (ceruloplazmin), DMT-1 (transporter dvovalentnih metala 1), DyctB (duodenalni citokrom B), Fer (feritin), Fpn (feroportin), HCP-1 (engl. heme-carrier protein 1), HO-1 (hem oksigenaza 1), LIP (labilni odjeljak željeza), Tf (transferin).

Željezo je u hrani prisutno u dva oblika, kao anorgansko i hemsko željezo. Anorganski oblik je dominantan oblik željeza u prehrani te čini oko 90 % ukupne količine željeza. Hemsko željezo predstavlja samo 10 % dijetalnog željeza, ali unatoč maloj zastupljenosti predstavlja biološki dostupni izvor čija je apsorpcija značajno učinkovitija od apsorpcije anorganskog željeza jer na nju ne utječu sastojci hrane koji značajno umanjuju apsorpciju anorganskog oblika (26, 27).

Apsorpcija anorganskog željeza

Najveći dio anorganskog željeza u prehrani nalazi se u trovalentnom obliku i prije apsorpcije mora se reducirati u dvovalentni oblik djelovanjem ferireduktaze, duodenalnog citokroma B (DyctB) na četkastom rubu duodenalnog epitela (20). Dvovalentno željezo se zatim transportira kroz apikalnu membranu enterocita u citoplazmu preko transportera dvovalentnih metala 1 (engl. divalent metal transporter 1, DMT-1) (28). DMT-1 ne posreduje samo u transportu željeza, već i ostalih dvovalentnih metalnih kationa uključujući cink, magnezij i bakar, iako mu je primarna fiziološka uloga transport željeza (28, 29). Ekspresija ovog transportnog proteina dokazana je i na membrani endosoma gdje posreduje u transportu željeza iz endosoma u citoplazmu stanice tijekom transferinskog ciklusa (1). Neka istraživanja su pokazala da DMT-1 ima ulogu u transportu željeza koje nije vezano za transferin (engl. non transferrin bounded iron, NTBI) u stanice, osobito u stanjima nakupljanja željeza (30).

Transport trovalentnog željeza u duodenumu odvija se odvojenim, manje ispitanim putom. Trovalentno željezo apsorbira se integrin-mobilferin putom koji posreduje samo u transportu trovalentnog željeza, ali ne i drugih nutricijski važnih metala (18, 31). Ovaj put uključuje nekoliko proteina: mobilferin, beta-3-integrin i flavin-monooksigenazu (Slika 2) (32, 33). Flavin-monooksigenaza ima ulogu ferireduktaze. U staničnom citosolu ovi proteini su povezani u veliki proteinski kompleks nazvan paraferitin (19). Western blot analiza paraferitina pokazala je da ovaj kompleks sadrži beta-2-mikroglobulin i DMT-1. Prisutnost znatne količine DMT-1, mobilferina i hefestina u citoplazmi stanica ukazuje na moguću ulogu ovih proteina u unutarstaničnom transportu željeza.

Apsorpcija hemskog željeza

Transport hema kroz biološke membrane nije nužan samo za apsorpciju u crijevima, već i za stanični promet željeza. Sinteza hema djelomično se odvija u mitohondriju nakon čega se hem mora transportirati u endoplazmatski retikulum da bi se vezao na proteine. Hem je također uključen u transkripcijsku regulaciju nekih gena te se zbog toga mora transportirati u staničnu jezgru (34). Ranija istraživanja su pokazala da se intaktna skupina hema na apikalnoj membrani enterocita apsorbira posredovanjem HCP-1 (engl. heme-carrier protein 1) čija je značajna ekspresija dokazana u duodenumu (2, 35). U enterocitima se željezo otpušta iz protoporfirinskog prstena djelovanjem hem oksigenaze 1 (HO-1). Nakon toga, dva oblika željeza, anorgansko i hemsko željezo, dijele jedinstveni put – ulaze u citosolni odjeljak

anorganskog željeza u enterocitima (Slika 2). Novija istraživanja su pokazale da je fiziološki supstrat za HCP-1, koji se sada naziva HCP-1/PCFT (engl. proton coupled folate transporter, PCFT), folat iako ovaj transportni protein može transportirati i hem, ali sa znatno manjim afinitetom. Tako transportni mehanizam hema u crijevima ostaje nerazjašnjen (36).

Transport željeza unutar stanice

Nakon ulaska željeza u enterocite preko apikalne membrane ono može biti pohranjeno u obliku feritina ili transportirano preko bazolateralne membrane u cirkulaciju. Enterociti koji apsorbiraju željezo obavljaju svoju funkciju svega dva dana i zatim bivaju odljušteni u lumen crijeva. Stoga se ljuštenjem intestinalnog epitela željezo koje nije transportirano iz enterocita u cirkulaciju gubi iz organizma. Zbog toga transport željeza preko bazolateralne membrane enterocita koji posreduje feroportin određuje da li će željezo ući u organizam ili neće. Da bi se transportiralo kroz bazolateralnu membranu željezo se prvo mora transportirati kroz citoplazmu do mjesta transporta. Transport željeza kroz citoplazmu predstavlja najmanje poznat korak apsorpcije željeza. Postoje dva moguća mehanizma transporta koji se međusobno ne isključuju: transport željeza posredovan proteinskim šaperonima i transcitozom (37). Iako detalji molekularnog mehanizma nisu u potpunosti razjašnjeni, citosolni monotiol glutaredoksini i poli(rC)-vežući proteini mogli bi djelovati kao šaperoni željeza predstavljajući osnovni stanični mehanizam transporta željeza (38-40).

Bazolateralni transport željeza

Feroportin predstavlja jedini do danas poznati protein koji transportira željezo iz stanica (15, 41, 42). Topologija feroportina nije u potpunosti razjašnjena kao ni broj transmembranskih domena. Feroportin prema različitim modelima ima 9-12 transmembranskih domena. Ekspresija ovog proteina dokazana je u svim tkivima koja transportiraju željezo u plazmu: bazolateralnoj membrani duodenalnih enterocita, membrani makrofaga RES-a, hepatocitima, stanicama placente. Mutacije u genu za feroportin uzrok su hemokromatoze tipa IV (16). Transport željeza kroz bazolateralnu membranu zahtjeva oksidaciju dvovalentnog u trovalentno željezo posredovanjem feroskidaze hefestina u duodenumu ili ceruloplazmina u drugim tkivima (Slika 2) (22, 24). Budući da osigurava koordinaciju između apsorpcije željeza, njegovog korištenja i pohrane u rezervama, transport željeza posredovan feroportinom strogo je kontroliran. Regulacija feroportina je vrlo složena i odvija se na transkripcijskoj, posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj razini.

Među najvažnijim fiziološkim signalima za povećanu apsorpciju željeza su hipoksija i anemija. Hipoksija vodi do značajnih promjena u transkripciji mnogih gena, pa tako i gena uključenih u metabolizam željeza. Temelj odgovora na hipoksiju je stabilizacija članova HIF (engl. hypoxia inducible factor) obitelji transkripcijskih faktora. U normalnim uvjetima HIF1α i HIF2α su citosolni proteini koje razgrađuju proteasomi. Signal za njihovu razgradnju je hidroksilacija prolinskih ostataka HIF-a. Hidroksilaciju prolina posreduju željezo, oksoglutarat i o kisiku ovisne prolil-hidroksilaze. U odsutnosti ovih molekula ne dolazi do hidroksilacije HIF1α i HIF2α i njihove razgradnje te se oni nakupljaju u jezgri, vežu se s HIF1β formirajući aktivni transkripcijski faktor. Promotorska regija gena za feroportin sadrži HRE (engl. HIF responsive elements), te se u hipoksiji povećava transkripcija ovog gena. Povećana eritropoetska aktivnost također povećava razinu mRNA za feroportin. Transkripciju feroportina nadalje induciraju željezo, hem i drugi prijelazni metali što ukazuje na moguću fiziološku ulogu ovog transportera i u transportu drugih prijelaznih metala. Upala također može utjecati na transkripciju feroportina. Injekcija lipopolisaharida kod miševa i štakora rezultirala je smanjenom transkripcijom feroportina u slezeni i crijevima, a učinak na transkripciju feroportina nije bio ovisan o nekom specifičnom citokinu (43). Transkripcijska regulacija feroportina razlikuje se u različitim tipovima stanica (44).

Na posttranskripcijskoj razini feroportin je reguliran IRE/IRP (engl. iron responsive elements/iron responsive proteins) sustavom. Glasnička RNA za feroportin (*Fpn1*) ima IRE u svojoj 5´-UTR (engl. 5´- untranslated region). Analizom transkripta iz mišjeg duodenuma i eritroblasta kao i humanih eritroblasta identificiran je transkript koji u svojoj strukturi nema IRE u 5´-UTR i nazvan je *Fpn1β.* Translacija *Fpn1β* nije osjetljiva na koncentraciju željeza (45, 46). U duodenumu je *Fpn1β* činio 25 % ukupnog *Fpn1,* ali je njegov udio bio puno veći u eritroblastima. Autori su zaključili da bi *Fpn1β* mogao omogućiti enterocitima izbjegavanje represije translacije djelovanjem IRE/IRP sustava u uvjetima nedostatka željeza (47).

Glavni regulator ekspresije feroportina na posttranslacijskoj razini je hepcidin. Vezanje hepcidina za feroportin inducira internalizaciju ovog transportera čime se regulira broj molekula feroportina. Rezultati istraživanja Zhanga i suradnika pokazali su da hepcidin može regulirati ekspresiju feroportina i na površini eritroidnih prekursora i zaključili da ta činjenica ima važne fiziološke implikacije. Budući da vezanje hepcidina za feroportin uzrokuje njegovo uklanjanje s površine stanične membrane, u eritroblastima feroportin može biti aktivan samo u stanjima nedostatka željeza kada je plazmatska koncentracija hepcidina

snižena. Kada željeza ima dovoljno smanjena ekspresija feroportina omogućava eritroblastima zadržavanje dovoljne količine željeza koja im je potrebna za sintezu hemoglobina, dok u uvjetima nedostatka željeza eritroblasti daju prioritet drugim tkivima kako ne bi došlo do teškog nedostatka željeza u tim tkivima. Budući da eritroblasti koriste najveći dio dnevnih potreba za željezom, više od 80 % transferinskih receptora tipa 1 (TfR1) *in vivo* nalazi se na eritroblastima, stoga je u stanjima nedostatka željeza za organizam korisnije smanjiti eritropoetsku aktivnost i prepustiti željezo vitalnim organima kao što su srce ili mozak. Ovime se može objasniti i zašto je sideropenična anemija često prvi jasni znak nedostatka željeza (48).

Hepcidin je jedini do sada identificirani ligand koji inducira internalizaciju feroportina, ali istraživanja su pokazala da se internalizacija može dogoditi i neovisno o hepcidinu. Tako je u makrofagima i neuronima gubitak funkcionalnog ceruloplazmina rezultirao uklanjanjem feroportina. Internalizacija feroportina zbog nedostatka ceruloplazmina bila je neovisna o hepcidinu (49, 50).

1.1.3. Transferin i transferinski ciklus

Plazmatski transport željeza

Plazmatski odjeljak željeza vezanog za transferin funkcionira kao prijelazni odjeljak kroz koji cirkulira oko 20 mg željeza na dan (51). Princip transporta željeza određen je njegovim kemijskim osobinama. Vezanje željeza za transferin, glavni transportni protein željeza u cirkulaciji, osigurava topivost, smanjuje reaktivnost te tako omogućava sigurnu i kontroliranu dostavu željeza svim stanicama u organizmu. Transferin je serumski glikoprotein molekulske mase oko 75-80 kDa. Molekula se sastoji od dvije globularne domene od kojih svaka sadrži specifično vezno mjesto za jedan ion trovalentnog željeza. Afinitet molekule transferina za željezo kod fiziološkog pH izrazito je visoki, stoga je gotovo svo željezo u cirkulaciji vezano za transferin (52). U uvjetima nakupljanja željeza u plazmi se može dokazati frakcija željeza koje nije vezano za transferin (engl. non-transferin binding iron, NTBI). Ovaj pojam se odnosi na sve oblike željeza u cirkulaciji vezane za druge molekule osim za transferin. Željezo je za ove molekule vezano značajno manjim afinitetom. Ovaj oblik željeza je vrlo reaktivan te može katalizirati Fentonov tip reakcije. NTBI je frakcija koja u uvjetima povećane saturacije transferina najviše doprinosi nakupljanju željeza u hepatocitima i može slobodno ući u stanice te se smatra pokazateljem toksičnosti željeza (53, 54).

Ulazak željeza u tkivne stanice

Željezo se u stanice prenosi endocitozom posredovanom transferinom u takozvanom transferinskom ciklusu. U fiziološkim uvjetima transferinski ciklus omogućava kontroliranu dostupnost željeza svim stanicama budući da pojedine stanice mogu učinkovito kontrolirati ulazak željeza reguliranjem ekspresije TfR1 s obzirom na vlastite potrebe.

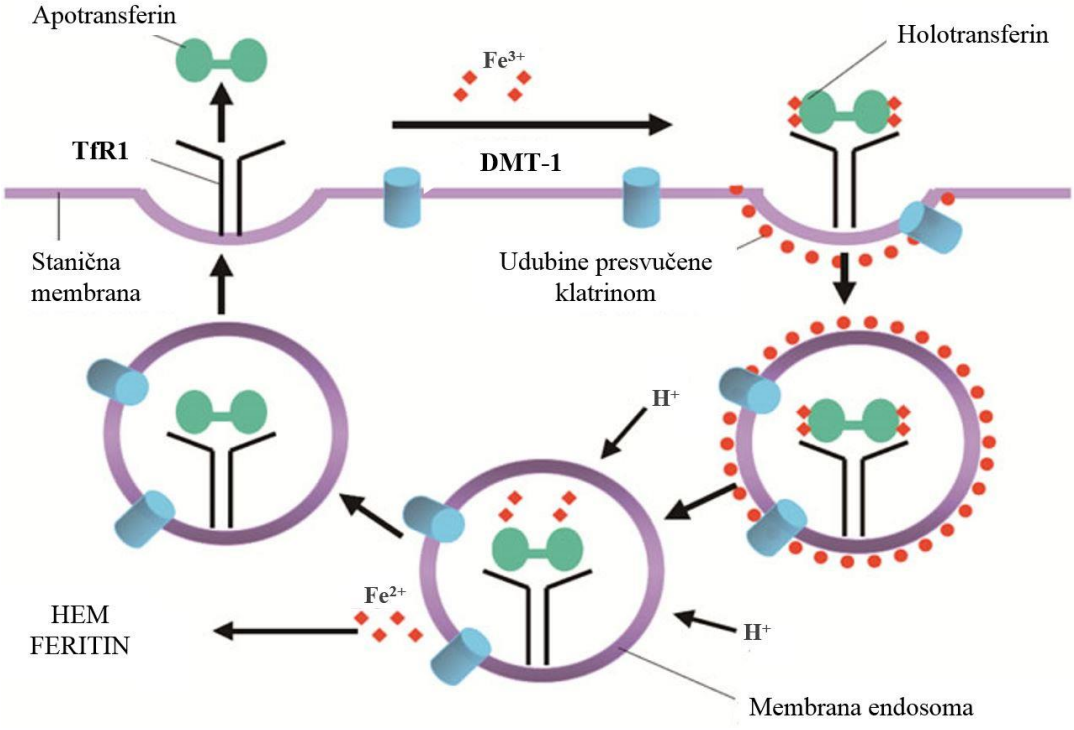
Do sada su opisana dva tipa funkcionalno različitih transferinskih receptora, TfR1 i transferinski receptori tipa 2 (TfR2). Iako TfR1 i TfR2 mogu vezati i endicitozom unijeti željezo u stanicu, različit afinitet ovih receptora za transferin i ekspresija u različitim tkivima ukazuje na njihovu različitu funkciju. Ekspresiju TfR1 pokazuju sve stanice, ali se razina ekspresije značajno razlikuje (21). Visoku razinu ekspresije pokazuju nezrele eritroidne stanice, stanice koje se brzo dijele (normalne i maligne), te tkivo placente. TfR1 je transmembranski glikoprotein molekulske mase 90 kDa, sastoji se od dviju identičnih podjedinica povezanih disulfidnom vezom. Svaka podjedinica posjeduje jedno vezno mjesto za transferin. Transferin koji ima vezana dva iona trovalentnog željeza ima veći afinitet za vezanje na TfR1 od transferina koji ima jedan vezani ion željeza što povećava učinkovitost staničnog transporta željeza posredovanog transferinom. Osim membranskog TfR1, u cirkulaciji je dokazano prisustvo topivih transferinskih receptora (sTfR). Ovaj oblik predstavlja topivi fragment izvanstanične domene ovog receptora koji se otpušta u cirkulaciju proteolitičkim kidanjem na C-kraju proteinske molekule TfR1. Jedno istraživanje je pokazalo da je otpuštanje sTfR-a regulirano vezanjem njegovog liganda transferina (55). Koncentracija sTfR-a u plazmi odraz je eritropoetske aktivnosti kao i dostupnosti funkcionalnog željeza jer se u stanjima snižene dostupnosti željeza povećava ekspresija TfR1 kako bi stanica osigurala što veću količinu željeza.

Ekspresiju TfR2 pokazuju hepatociti, hematopoetske stanice te duodenalne stanice kripta, a njegova se ekspresija preklapa s ekspresijom HFE (eng. hereditary hemochromatosis protein). TfR2 se veže za HFE i transferin, ali su domene interakcije HFE s TfR2 različite od domena interakcije s TfR1. Pretpostavlja se da je interakcija TfR2/HFE važna za transkripcijsku regulaciju hepcidina posredovanu transferinom (56-60). Eritroidni TfR2 veže se na i stabilizira receptor za eritropoetin na površini eritroblasta i važan je za kontrolu stvaranja eritrocita u stanjima nedostatka željeza (61). Nedavno su *in vitro* istraživanja pokazala da postoji i topivi oblik ovog receptora – sTfR2 čije je nastajanje regulirano saturacijom transferina. Vezanje holotransferina, transferina koji ima vezana dva iona

trovalentnog željeza, za TfR2 inhibira otpuštanje topive forme dok se ono povećava u nedostatku vezanja liganda kako u stanicama hepatoma tako i u eritroidnim stanicama (62).

Transferinski ciklus

Vezanjem holotransferina za TfR1 na površini stanice započinje stvaranje endosoma posredovano klatrinom i transferinski ciklus. Djelovanjem protonske pumpe na membrani endosoma dolazi do zakiseljavanja njegovog sadržaja što vodi do konformacijskih promjena transferina i TfR1 te rezultira otpuštanjem željeza (63). Trovalentno željezo se reducira djelovanjem ferireduktaze STEAP3 (eng. six transmembrane prostate protein 3) i željezo se transportira preko membrane endosoma u citoplazmu posredovanjem DMT-1 (64). Molekula apotransferina (transferin na koji nije vezano željezo) vraća se na površinu stanice i otpušta u cirkulaciju, čime završava transferinski ciklus (Slika 3). Transferin u cirkulaciji može ponovno vezati željezo, a TfR1 molekule transferina. Tijekom svog vijeka transferin sudjeluje u 100-200 ciklusa transporta željeza.



Slika 3. Transferinski ciklus.
Transferinski ciklus posreduje u reguliranom usku željeza u stanice u skladu s njihovim potrebama. TfR1(transferinski receptor tipa 1), DMT-1 (transporter dvovalentnih metala 1). Preuzeto i prilagođeno prema Elliottu RL i suradnicima (65).

U normalnim okolnostima transferinski ciklus je glavni put ulaska željeza u stanice, ali u uvjetima patološkog nakupljanja željeza dolazi do zasićenja veznih mjesta na transferinu i u cirkulaciji se pojavljuje NTBI koje može ući u stanice putovima neovisnim o transferinu (54).

Nakon transporta u stanicu željezo ulazi u takozvani ″labilni odjeljak željeza″ (engl. labile iron pool, LIP). Ovaj odjeljak sačinjava željezo koje je slabim afinitetom vezano za druge molekule: citrat, ATP, aminokiseline, askorbinsku kiselinu. Nedavno istraživanje je ustanovilo da je glavna komponenta ovog odjeljka dvovalentno željezo vezano za glutation (66). LIP predstavlja <5 % ukupnog staničnog željeza (67). Ovaj dinamični odjeljak opskrbljuje željezom mitohondrije koji ga koriste za sintezu hema i enzima koji sadrže Fe-S ili se koristi za sintezu citosolnih proteina koji sadrže ovaj element. Količina željeza koja prelazi potrebe stanice za sintezu hema i ostalih proteina koji sadrže željezo pohranjuje se u obliku feritina da bi se smanjila količina slobodnog željeza, jer je LIP odjeljak sposoban katalizirati Fentonov tip reakcije (68).

Nedavno istraživanje je otkrilo dvostruku ulogu glikolitičkog enzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) kao membranski vezanog i topivog receptora koji omogućava alternativni put unosa transferinskog željeza u stanice kada postoji povećana potreba stanica za željezom (69).

1.1.4. Rezervno željezo: feritin i hemosiderin

Željezo se u organizmu nalazi pohranjeno u hepatocitima i Kupfferovim stanicama u jetri u obliku feritina i hemosiderina. Kada je količina željeza u stanici veća od njenih potreba, suvišno željezo se pohranjuje u biološki dostupnom obliku, u molekulu feritina, čime se stanica štiti od potencijalno toksičnih reakcija kataliziranih željezom (70). Tako feritin u stanici ima dvostruku ulogu: detoksikacije i pohranjivanja. Molekulu feritina sačinjavaju 24 podjedinice dvaju različitih tipova: H (eng. heavy ili heart Mr≈21 000 Da) i L (engl. light ili liver Mr≈19 000 Da) koje formiraju kuglastu strukturu. Omjer H i L podjedinica u molekuli feritina razlikuje se ovisno o tipu tkiva. Pohranjivanje željeza u feritin zahtjeva feroksidaznu aktivnost koja se pripisuje H podjedinici, dok L podjedinica ima ulogu u mineralizaciji (71). Molekula feritina ima Mr≈450 000 Da i može akumulirati oko 4500 atoma željeza (29). Željezo iz feritina stanica koristiti kada je ono potrebno, ali točni molekularni mehanizmi otpuštanja željeza iz molekule feritina još nisu u potpunosti razjašnjeni (72-74).

Iako se većina feritina nalazi u citoplazmi, mala frakcija je nađena i u jezgri nekih stanica. Pretpostavlja se da feritin u jezgri ima ulogu dostavljanja željeza nekim enzimima ili transkripcijskim faktorima čija aktivnost ovisi o željezu, ali bi mogao imati i ulogu u zaštiti DNA od oksidacijskog oštećenja uklanjanjem slobodnog željeza (75, 76). Nedavno je otkriven i mitohondrijski oblik feritina. Mitohondriji su organele u kojima se sintetizira hem kao i proteini koji sadrže Fe-S skupinu. Budući da nedostatak željeza kao i suvišak remete metaboličku i respiracijsku aktivnost mitohondrija, homeostaza željeza u mitohondriju mora biti pod strogom kontrolom (77).

Dok se većina feritina nalazi u stanicama, mala količina feritina nalazi se u cirkulaciji. Porijeklo i način sekrecije feritina nisu u potpunosti poznati, ali biofizikalne osobine ukazuju na aktivnu sekreciju lizosomalnim sekrecijskim putom (78, 79). Plazmatski feritin gotovo i ne sadrži željezo i njegova biološka funkcija nije razjašnjena. Neki autori ukazuju na ulogu feritina u uklanjanju slobodnog željeza, ali je moguće da ima i ulogu modulatora upale (27). Izvanstanični feritin može imati funkciju transportera koji osigurava željezo tkivima (80, 81). Koncentracija plazmatskog feritina koristi se kao indikator rezervi željeza pri čemu plazmatska koncentracija feritina od 1 μg/L odgovara 8-10 mg tkivnih rezervi željeza (82, 83).

Drugi oblik rezervnog željeza u stanicama je hemosiderin, netopivi produkt nepotpune lizosomalne razgradnje feritina. U stanjima nakupljanja željeza hemosiderin postaje dominantan oblik rezervnog željeza. U fiziološkim stanjima hemosiderin nije učinkovit donor željeza, te ima zaštitnu ulogu. U stanjima upale i hipoksije može biti izvor željeza, te katalizirati stvaranje slobodnih radikala i oštećenje tkiva (84).

1.1.5. Sistemska homeostaze željeza

Budući da nije poznat način reguliranog izlučivanja željeza, sadržaj željeza u organizmu regulira se strogom kontrolom njegove apsorpcije. Crijevna sluznica odgovara na promjene u statusu željeza, tkivnu hipoksiju, upalne signale i time prilagođava razinu apsorpcije. Apsorpcija se povećava kada u organizmu nedostaje željeza i smanjuje u stanjima njegovog nakupljanja. Zbog esencijalne uloge duodenalne apsorpcije željeza u sistemskoj homeostazi željeza, ona je regulirana višestrukim, međusobno povezanim regulacijskim putovima: (a) regulacijom stanične homeostaze željeza posredovanom IRE/IRP; (b) transkripcijskom regulacijom posredovanom HIF2α (eng. hypoxia inducible factor 2α); (c) regulacijom sistemske homeostaze željeza posredovanom hepcidinom. Ovi mehanizmi reguliraju homeostazu željeza na različitim razinama, a interakcija i kooperacija ovih mehanizama omogućava finu regulaciju homeostaze željeza *in vivo* (85).

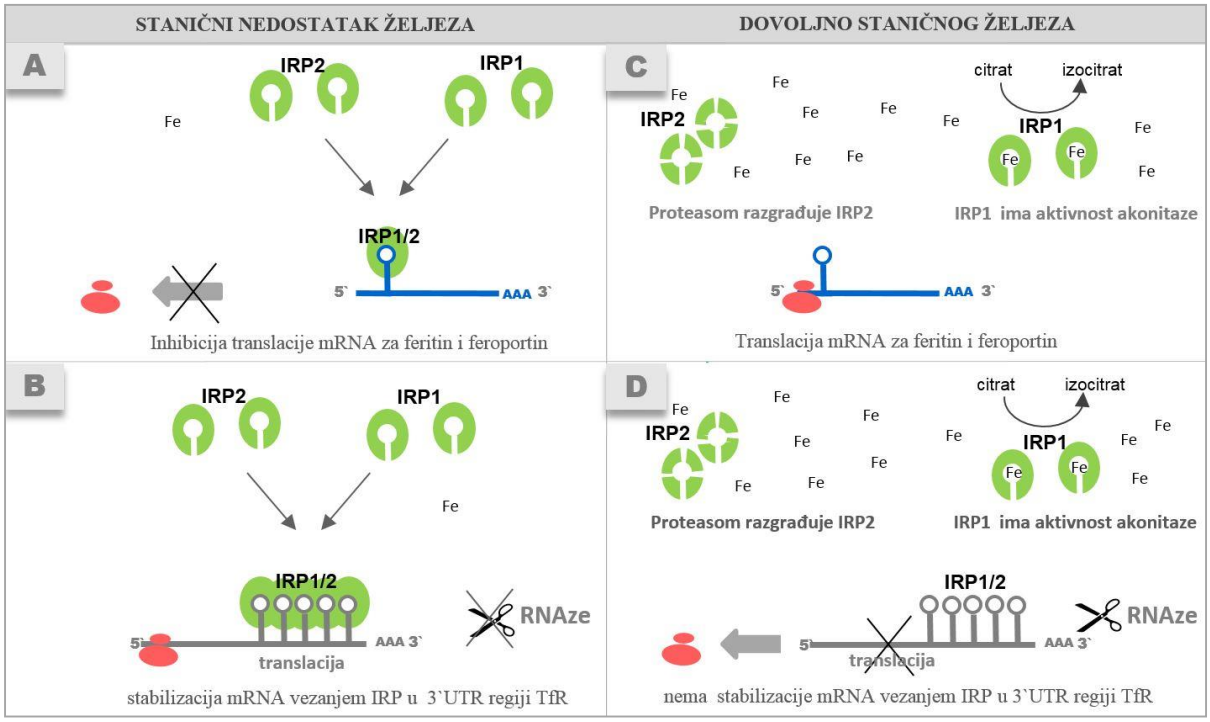
Uloga sistemske homeostaze počiva na koordiniranoj regulaciji intestinalne apsorpcije željeza i njegovog recikliranja iz RES-a i rezervi u hepatocitima. Glavni cilj regulacije je osiguravanje dovoljne količine željeza za eritropoezu te osiguravanje stabilne sredine u kojoj svaka stanica prilagođava ulazak željeza vlastitim potrebama.

Regulacija stanične homeostaze željeza posredovana IRE/IRP

Nedostatak željeza kao i njegovo nakupljanje štetno je za stanicu, stoga ulazak, pohranjivanje, distribucija unutar stanice kao i transport iz stanice moraju biti dobro kontrolirani. Nakupljanje suvišnog željeza u stanici može dovesti do oksidacijskog stresa i oštećenja staničnih molekula (DNA, proteina i lipida) djelovanjem reaktivnih vrsta kisika. Sustav IRE/IRP registrira staničnu razinu željeza i koordinira ove procese predstavljajući osnovni sustav regulacije staničnog metabolizma željeza.

IRP1 je svestran citosolni Fe-S protein. Kada je stanični sadržaj željeza dovoljan IRP1 djeluje kao citosolna akonitaza i nema sposobnost vezanje za RNA (86). IRP2 funkcionira isključivo kao protein koji se veže za RNA te u prisutnosti željeza dolazi do njegove razgradnje dok se u odsutnosti željeza veže za IRE. Ablacija gena za IRP1 i IRP2 je pokazala da IRP2 ima dominantan značaj u homeostazi željeza (87). Ovi proteini vežu se specifično na regije RNA koje imaju konformaciju petlje (eng. stem loops), poznate kao IRE i posttranskripcijski modificiraju ekspresiju proteina uključenih u metabolizam željeza. Vezanje IRE-IRP ima dva različita učinka ovisno o lokaciji IRE obzirom na kodirajuću regiju.

Vezanje IRP za IRE u 3´ UTR (engl. untranslated region) stabilizira transkript i sprječava razgradnju mRNA povećavajući translaciju mRNA i sintezu proteina. Vezanje IRP u području 5´-UTR rezultira represijom translacije, sprječavanjem vezanja mRNA za ribosome i tako smanjuje sintezu proteina (Slika 4). Na ovaj način željezo modulira sintezu različitih proteina uključenih u metabolizam željeza, sintezu hema i ciklus limunske kiseline. IRE u 5´-UTR mRNA sadrže mRNA za feritin, feroportin, 5-aminolevulinat sintetazu i HIF2α, dok IRE u 3´-UTR sadrže mRNA za TfR1 i DMT1. Nedavno je identificirano 35 mRNA koje vežu IRP1 ili IRP2 (88).



Slika 4. Održavanje stanične homeostaze željeza IRE/IRP sustavom.

Kada stanici nedostaje željeza vezanje IRP1/2 za 5´-UTR IRE mRNA za feritin i feroportin blokira translaciju ovih proteina ometajući inicijaciju translacije (A); Vezanje IRP1/2 za 3´-UTR IRE mRNA za TfR stabilizira transkript (B). U stanicama koje sadrže dovoljnu količinu željeza IRP1 ima aktivnost akonitaze, a IRP2 razgrađuju proteaze te se translacija mRNA za feritin i feroportin odvija nesmetano (C); U prisutnosti dovoljne količine željeza ne dolazi do vezanja IRP1/2 za 3´-UTR pa ne dolazi do stabilizacije transkripta za TfR1 što za posljedicu ima smanjen broj molekula TfR1 na površini stanice i smanjen transport željeza u stanicu (D).

IRE (engl. iron responsive element), IRP1/2 (engl. iron responsive protein 1/2), TfR1 (transferinski receptor tipa 1), 3´-UTR(engl. 3´-untranslated region), 5´-UTR (engl. 5´-untranslated region).

Kada je stanični sadržaj željeza dovoljan, IRP1 i IRP2 gube afinitet za vezanje za RNA, kao posljedica ovoga sinteza feritina je aktivirana, dok je istovremeno pojačana razgradnja mRNA za TfR1 jer transkript nije stabiliziran vezanjem IRP. Suprotno, kada je stanični sadržaj željeza nizak IRP se veže za IRE na mRNA feritina u 5´-UTR regiji i blokira njegovu translaciju dok istovremeno vezanje ovih proteina za 3´-UTR mRNA TfR1 stabilizira transkript čime se povećava transport željeza u stanicu. Željezo nije jedini modulator IRP-1 aktivnosti, ni razine IRP2. Osim željeza na ovaj regulacijski sustav utječe NO, fosforilacija posredovana protein kinazom C, oksidacijski stres te hipoksija, modulirajući metabolizam željeza u stanicama i tkivima (89).

Regulacija transkripcije posredovana HIF2α

U kontroli apsorpcije na transkripcijskoj razini sudjeluje HIF2α koji regulira ekspresiju proteina koji sudjeluju u transportu kod nedostatka željeza i stanjima anemije: feroportina, DMT-1 te DyctB koji u promotorskoj regiji gena sadrže HRE (90).

Na posttranslacijskoj razini glavnu ulogu u regulaciji ima jetreni hormon hepcidin.

1.1.6. Hepcidin

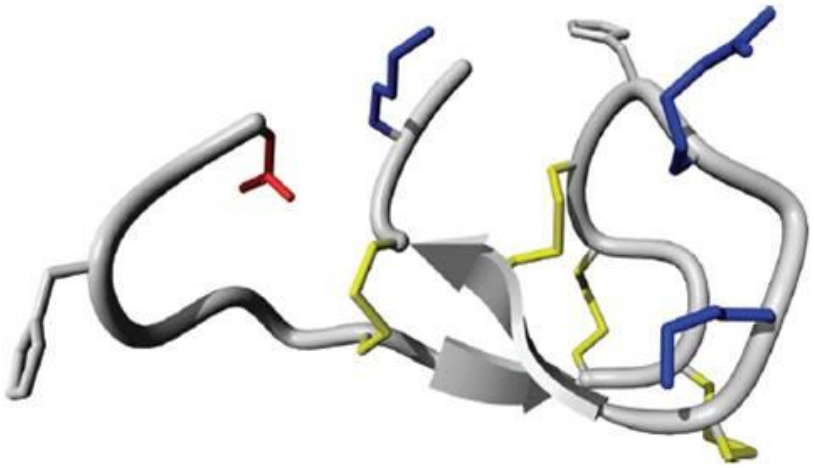
Tijekom ispitivanja antimikrobnih svojstava različitih tjelesnih tekućina Park i suradnici izolirali su iz humane mokraće novi peptid i nazvali ga hepcidin na osnovi mjesta njegove sinteze (jetra, hep-) i antibakterijskih svojstava (-cidin) (91). Neovisno o ovom istraživanju isti peptid izoliran je iz ultrafiltrata plazme i nazvan LEAP-1 (engl. liver-expressed antimicrobial peptide) (92). Povezanost između hepcidina i metabolizma željeza otkrivena je tek kasnije tijekom ispitivanja jetrenog odgovora na nakupljanje željeza (93).

Na modelu transgeničnih miševa s prekomjernom ekspresijom hepcidina u jetri pokazalo se da je hepcidin negativni regulator placentarnog transporta željeza (94). Ovi transgenični miševi uginuli su ubrzo nakon okota od izrazitog nedostatka željeza. Zapažanja u ovim istraživanjima pokazala su da hepcidin može blokirati transport željeza na više mjesta uključujući intestinalni epitel, placentu i makrofage. Analiza tumorskog tkiva dva bolesnika s velikim adenomom jetre i jakom mikrocitnom anemijom neosjetljivom na željezo pokazala je da tumorsko tkivo ima povećanu autonomnu ekspresiju mRNA za hepcidin što je vjerojatno uzrokovalo anemiju, te je još jednom potvrdilo ulogu hepcidina u metabolizmu željeza.

U ovom kliničkom sindromu se pokazalo da je resekcija tumora u potpunosti uklonila hematološke simptome (95).

Kod ljudi sintezu hepcidina kodira *Hamp* gen na 19. kromosomu. Glavno mjesto ekspresije *Hamp* gena je jetra, ali istraživanja su pokazala da se hepcidin osim u hepatocitima sintetizira i u drugim tkivima: bubregu, srcu, plućima (96). Ovaj hormon se sintetizira kao pre-pro-peptid koji je građen od 84 aminokiseline, čijim kidanjem nastaje prohepcidin (64 aminokiseline). Djelovanjem prohormon konvertaze furina, uklanja se proregija, te nastaje zreli, biološki aktivni oblik hormona – hepcidin (97). U cirkulaciji osim aktivnog oblika hormona hepcidina-25, cirkulira i peptid od 22 aminokiseline i biološki inaktivni prohepcidin (96, 98). Zreli oblik hepcidina u plazmi cirkulira vezan na α2-makroglobulin i albumin, iako je udio ovih vezanih oblika u odnosu na slobodni hepcidin još uvijek nepoznat (99, 100). Nedavno istraživanje je pokazalo da je hepcidin u cirkulaciji vezan na α2-makroglobulin s relativno visokim i albumin s relativno niskim afinitetom. Na temelju teorijskih izračuna procjenjuje se da u plazmi cirkulira oko 11 % slobodnog hepcidina, međutim, nije jasno utvrđeno je li vezanje na ove proteine utječe na funkcionalna svojstva hepcidina. Uklanjanje hepcidina iz cirkulacije događa se nakon vezanja za njegov funkcionalni receptor feroportin, ali i ekskrecijom u bubrezima. Zbog male molekularne mase i malog radijusa, nevezani hepcidin vjerojatno prolazi glomerularni filter. U istraživanju provedenom na ljudima izračunato je da je frakcionirana ekskrecija hepcidina samo 0-5 % vjerojatno zbog reapsorpcije poput drugih peptida male molekularne mase ili se ovaj peptid ne filtrira slobodno u glomerulu (101).

Za razliku od drugih peptida s antimikrobnim djelovanjem, struktura hepcidina gotovo je identična kod različitih vrsta sisavaca. Hepcidin je cisteinom bogat kationski peptid koji sadrži osam cisteinskih ostataka vezanih u četiri disulfidne veze. Molekula ima strukturu jednostavne ukosnice čije su dvije ruke međusobno povezane disulfidnim vezama u konfiguraciju nalik ljestvama (Slika 5) (102). Korištenjem različitih metoda ustanovljeno je da se način vezanja cisteinskih ostataka razlikuje od prvobitno pretpostavljenog. Dokazano je da su cisteinski ostaci povezani na sljedeći način: Cys^1–Cys^8, Cys^3–Cys^6, Cys^2–Cys^4 i Cys^5–Cys^7 (Slika 5) (103). N-kraj hepcidina esencijalan je za njegovu aktivnost budući da se uklanjanjem pet aminokiselina N-kraja gubi sposobnost induciranja endocitoze feroportina (104). Štoviše, prvih devet aminokiselina dovoljno je za indukciju endocitoze ovog receptora. Pokazalo se da su dva bočna ostatka fenilalanina, F4 i F9 također važni za aktivnost hepcidina (105).

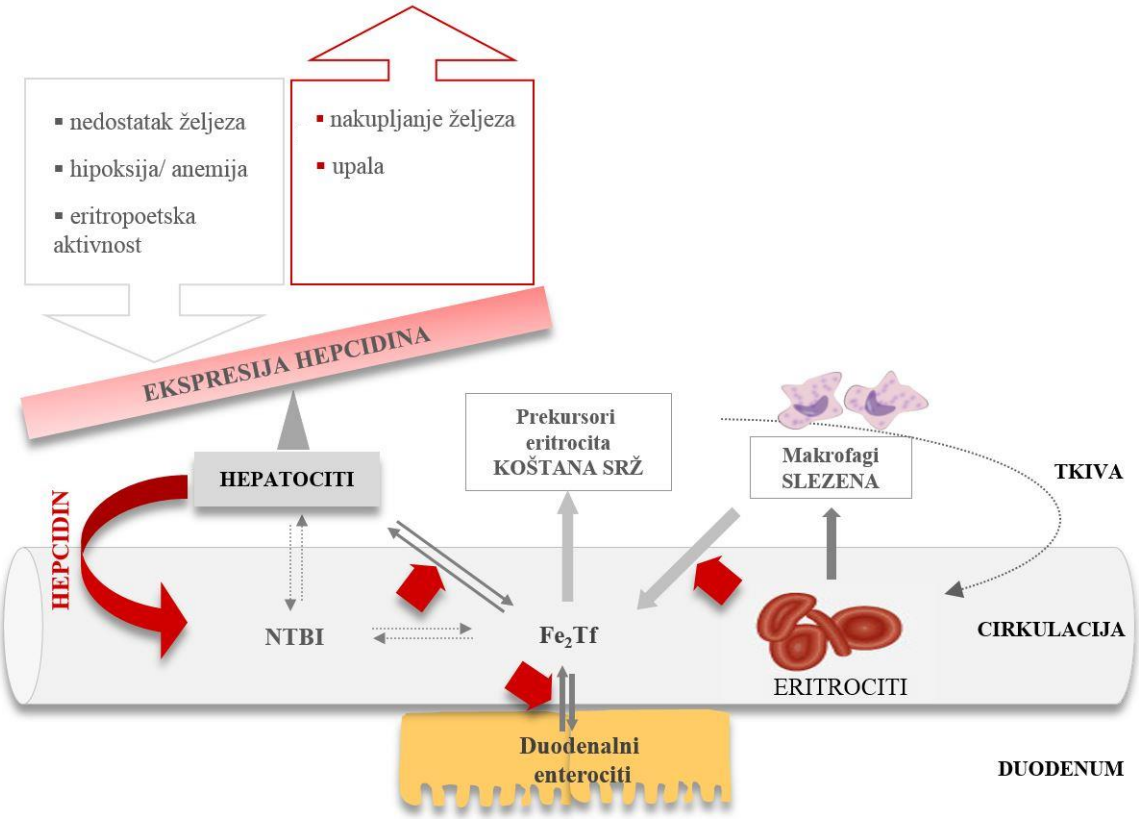


Slika 5. Molekulska struktura hepcidina.
Beta-ploče su prikazane sivim strelicama, peptidni kostur (sivo), disulfidne veze (žuto), pozitivno nabijeni argininski i lizinski ostaci (plavo), negativno nabijeni ostaci aspartata (crveno). Preuzeto iz Jordan JB i suradnici (103).

Više istraživanja je dokazalo antibakterijsku aktivnost hepcidina-25 i hepcidina-20 prema velikom broju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Oba oblika pokazivali su baktericidno djelovanje u koncentrciji između 3,25 i 50 µg/ml. Hepcidin-20 pokazivao je antimikrobno djelovanje kod nižih koncentracija ukazujući na činjenicu da nastajanje hepcidina-20 *in vivo* vjerojatno nije samo posljedica katabolizma hepcidina, već rezultira nastankom peptida većeg antibakterijskog potencijala (106). Fiziološki značaj antimikrobne aktivnosti nije razjašnjen, ali ukazuje na moguću ulogu hepcidina u prirođenoj imunosti. Dokazano je također da proregija hepcidina ima bakteriostatsku aktivnost, pretpostavlja se mehanizmom interferencije s unutarstaničnim nukleinskim kiselinama, te kao takva može doprinijeti urođenom imunosnom odgovoru (107).

Na molekularnoj razini hepcidin se veže za svoj funkcionalni receptor feroportin čime uzrokuje njegovu internalizaciju, ubikvitinaciju i razgradnju u lizosomima (108). Feroportin predstavlja jedini poznati transporter koji posreduje u transportu željeza iz stanica. Ovaj transportni protein nalazi se u svim tkivima koja transportiraju željezo u plazmu: bazolateralnoj membrani duodenalnih enterocita, membrani makrofaga RES-a, hepatocita i stanicama placente. Uklanjanje feroportina s površine stanične membrane dovodi do

zadržavanja željeza u stanici i smanjuje izlazak željeza iz makrofaga RES-a, hepatocita i enterocita u krvotok čime se smanjuje dostupnost željeza različitim stanicama u organizmu (Slika 6) (109). Jedno istraživanje je pokazalo da vezanje hepcidina za feroportin ima druge učinke osim internalizacije feroportina, uključujući i značajne tanskripcijske promjene koje mogu imati učinak i na DMT-1 (110).



Slika 6. Regulacija sistemske homeostaze željeza djelovanjem hepcidina.
NTBI (engl. non transferrin bind iron); Tf (transferin).

Vezno mjesto ze hepcidin identificirano je na izvanstaničnoj omči feroportina na kojoj se nalazi cisteinski ostatak C326 koji je nužan za vezanje feroportina (111). Mutacija u C326 vodi do hemokromatoze neosjetljive na hepcidin (112). Vezanje hepcidina za feroportin vodi do vezanja citosolne Janus kinaze (JAK2) koja je član JAK-STAT signalne obitelji (113). Dolazi do autofosforilacije JAK2 i zatim fosforilacije feroportina na jednom od dva susjedna tirozina. Fosforilirani feroportin se uklanja s površine stanice stvaranjem udubina presvučenih klatrinom (108). Feroportin se zatim razgrađuje u lizosomima djelovanjem lizosomalnih

hidrolaza, ali da bi mogao ući u lizosome prvo mora ući u lumen multivezikularnih tjelešaca koja se zatim fuzioniraju s lizosomima. Ulazak membranskih proteina u multivezikularna tjelešca zahtjeva vezanje s ubikvitinom i prepoznavanje vezanog ubikvitina skupinom citosolnih proteina nazvanih ESCRT (eng. endosomal sorting complex required for transport) proteini (108).

Poremećena regulacija sinteze hepcidina, bilo nasljedna ili stečena, uzrok je poremećaja metabolizma željeza. Kod zdrave osobe, povećanje količine željeza u organizmu vodi do povećane ekspresije gena za hepcidin čime se smanjuje apsorpcija željeza. Kod osoba koje imaju hereditarnu hemokromatozu, uslijed neodgovarajućeg ili neučinkovitog uklanjanja feroportina s površine stanične membrane posredovanog hepcidinom, apsorpcija željeza se nastavlja unatoč povećanoj količini željeza u organizmu (114, 115). Suprotno tome, pojačana ekspresija *Hamp* gena povezana je s pojavom sideropenične, mikrocitne anemije neosjetljive na željezo (94, 116).

1.1.7. Regulacija ekspresije hepcidina

Ekspresija hepcidina regulira se na transkripcijskoj razini i nema dokaza drugih načina kontrole. Četiri su do sada poznata puta regulacije ekspresije hepcidina: statusom željeza (rezervama željeza i plazmatskim željezom) u organizmu, upalom, hipoksijom/anemijom, eritroidnim faktorima (117, 118). Niz molekula uključeno je u regulaciju sinteze hepcidina (Tablica 3).

Ekspresiju hepcidina potiču povećana količina željeza u jetrenom tkivu, povećana saturacija transferina i upala, dok ekspresiju smanjuje nedostatak željeza, eritropoetska aktivnost i hipoksija (Slika 6) (131).

Istraživanja su pokazala da još nekoliko molekula smanjuje ekspresiju hepcidina u jetri: epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, faktor nekroze tumora α (engl. tumor necrosis factor–α, TNF-α), estrogen i testosteron, iako njihova točna uloga u održavanju homeostaze željeza još uvijek nije razjašnjena (131).

Tablica 3. Molekule uključene u regulaciju sinteze hepcidina

Molekule uključene u regulaciju sinteze hepcidina
Eritropoetin - hormon esencijalan za diferencijaciju eritroblasta, eritroidni regulator ekspresije hepcidina (119)
GDF15 (eng. growth differentiation factor 15) - secerniraju ga eritroblasti tijekom zadnjeg stadija sazrijevanja; eritroidni regulator ekspresije hepcidina (120)
Hemojuvelin - molekula uključena u regulaciju sinteze hepcidina statusom željeza (121-123)
HFE (eng. hereditary hemochromatosis protein) - mutacija u genu za HFE dokazana je kod hereditarne hemokromatoze tipa I (58)
TfR2 (transferinski receptor tipa 2) - molekula uključena u regulaciju sinteze hepcidina statusom željeza (57, 124, 125)
Matriptaza-2 - esencijalna komponenta puta koji detektira nedostatak željeza (126, 27)
TWSG1 (eng. twisted gastrulation protein homologe 1) - serinska proteaza koju sintetiziraju nezreli eritroidni prekursori, eritroidni regulator ekspresije hepcidina (128)
IL-6 (interleukin 6) - povećava ekspresiju gena za hepcidin tijekom upale (129)
Eritroferon - hormon koji sintetiziraju eritroblasti kao odgovor na stimulaciju eritropoetinom, a posreduje u supresiji hepcidina (130)

Regulacija hepcidina statusom željeza

Poput drugih hormona hepcidin je reguliran povratnom spregom sa supstancijom čiju koncentraciju regulira - željezom. Istraživanja su pokazala da rezervno željezo u jetri i ono vezano za transferin u cirkulaciji različitim signalima utječu na ekspresiju hepcidina u hepatocitima (132).

Kod bolesnika koji boluju od hereditarne hemokromatoze (HH) uzrokovane mutacijama u gena za HFE, TfR2 i hemojuvelin (HJV) koncentracija hepcidina u krvi je niska unatoč nakupljanju željeza u organizmu, što upućuje na ulogu ovih molekula kao izravnih ili neizravnih regulatora sinteze hepcidina (121-124). Istraživanja ukazuju da dva tipa transferinskih receptora, TfR1 i TfR2, zajedno s membranskim proteinom HFE imaju ulogu senzora holotransferina. Dokazano je da se TfR1 i TfR2 natječu za vezanje na HFE jer im se mjesta vezanja preklapaju. Pretpostavlja se da u stanjima visoke saturacije transferina, HFE

otpušta TfR1 i veže se za TfR2 putem domene koja je različita od one uključene u HFE/TfR1 interakciju te aktivira transkripciju *Hamp* gena (56).

Za bazalnu regulaciju transkripcije hepcidina važna je signalna kaskada BMP/SMAD (engl. bone morphogenic protein/sons of mothers against decapentaplegic) (133). Promotor gena za hepcidin sadrži element koji odgovara na BMP (eng. BMP-responsive element), a koji regulira transkripciju *Hamp* gena. Specifičnost BMP/SMAD puta u jetri i njegova uloge u regulaciji metabolizma željeza ovise o dva faktora koji pokazuju ekspresiju uglavnom u jetri: BMP6 i HJV. HJV je glikofosfatidil-inozitolom vezan membranski protein čija je ekspresija dokazana u srčanom mišiću, skeletnim mišićima i jetri. Molekule HJV i TfR2 smještene su na istoj, bazolateralnoj membrani što ukazuje na interakciju ovih proteina. Njihov smještaj omogućava im izravni kontakt s krvotokom i ukazuje na moguću ulogu ovih molekula kao ″senzora″ statusa željeza (125-134). Osim membranske forme u cirkulaciji su dokazane i topivog oblika HJV (sHJV). Dokazano je da rekombinantni sHJV ima sposobnost inhibicije BMP-SMAD signalnog puta i hepcidina, ali izvor i funkcija endogenog sHJV još uvijek nije razjašnjena (135).

Ni BMP receptori, ni hemojuvelin ne detektiraju status željeza izravno, već interakcijom s molekulama koje imaju tu sposobnost. Prema rezultatima istraživanja jetrena transmembranska serinska proteaza, matriptaza-2 i neogenin reguliraju sintezu hepcidina vjerojatno modulirajući koncentraciju hemojuvelina na staničnoj membrani.

Sinteza hepcidina u jetri povećava se kao odgovor na stanični sadržaj željeza u jetri. Stanični senzori kao i mehanizam regulacije nisu razjašnjeni, ali se čini da ne uključuju HFE, TfR2 ili HJV (136). Ustanovljena je uska povezanost između jetrenog sadržaja željeza i ekspresije Bmp6 mRNA u jetri miševa što ukazuje da količina željeza u jetri regulira ekspresiju Bmp6 mRNA (137).

Regulacija hepcidina upalom

Upala uzrokovana infekcijom, autoimunim procesima ili zloćudnim bolestima stimulira sintezu mnogih proupalnih citokina kao što su interleukin 6 (IL-6) i interferon-γ koji potiču ekspresiju hepcidina u jetri. Sinteza hepcidina inducirana citokinima vodi do funkcionalnog deficita željeza koji leži u podlozi AKB te se hepcidin smatra glavnim posrednikom ovog tipa anemije (138, 139).

Hepcidin je protein akutne faze tipa II čiju sintezu potiče IL-6, ali ne i citokini koji su uključeni u upalni odgovor tipa I uključujući TNF-α ili interleukin 1 (140-142). IL-6 je pleiotropni citokin koji ima značajnu ulogu u hematopoezi, imunosnom odgovoru i onkogenezi. Kao vrlo moćan proupalni citokin IL-6 igra glavnu ulogu u obrani domaćina od patogena i akutnog stresa. Tijekom odgovora akutne faze IL-6 kojeg sintetiziraju imunosne stanice na mjestu ozljede, otpušta se u cirkulaciju kojom dolazi do jetre gdje potiče sintezu proteina akutne faze. Povećana ili neregulirana ekspresija IL-6 značajno doprinosi patogenezi različitih humanih oboljenja. IL-6 mogu sintetizirati različiti tipovi stanica uključujući monocite, makrofage, limfocite, fibroblaste, keratinocite, endotelne stanice kao i neke tumorske stanice (143). Nedavno istraživanje je pokazalo da i sami hepatociti imaju sposobnost sinteze IL-6 kao odgovor na specifični stimulans, npr. lipopolisaharid (144).

IL-6 potiče ekspresiju hepcidina aktivirajući JAK2/STAT3 (engl. Janus kinase 2/signal transducer and activators of transcription 3) signalni put koji započinje fosforilacijom STAT3 (145). Translokacija fosforiliranog STAT3 u jezgru i vezanje za STAT3 vezno mjesto u proksimalnom promotoru gena za hepcidin rezultira povećanom ekspresijom hepcidina. Povećana sinteza hepcidina rezultira zadržavanjem željeza u makrofagima RES-a i smanjenom apsorpcijom u crijevima što za posljedicu ima hipoferemiju, te smanjuje dostupnost željeza patogenima (129, 142). Smanjena dostupnosti željeza važna je komponenta urođenog imuniteta koja doprinosi obrani domaćina od patogena i tumorskih stanica (146). Uz ovaj za organizam koristan učinak, ograničena dostupnost željeza limitirajući je čimbenik u sintezi hemoglobina, te rezultira razvojem anemije. Porast plazmatske koncentracije hepcidina kojeg stimulira IL-6 blokira otpuštanje željeza iz makrofaga koji recikliraju željezo iz eritrocita. Željezo vezano za transferin u plazmi predstavlja oko 0,1 % ukupnog sadržaja željeza u organizmu i funkcionira kao prijelazni odjeljak koji se izmjeni svaka četiri sata. Kada se brzina otpuštanja željeza iz makrofaga smanji, plazmatska koncentracija željeza naglo se smanjuje. Budući da najveću količinu željaza koriste prekursori eritrocita, smanjena raspoloživost željeza ograničava sintezu hemoglobina što rezultira anemijom (129). Infuzija rekombinantnog IL-6 kod zdravih dobrovoljaca izazvala je povećanje koncentracije serumskog hepcidina i smanjenje koncentracije serumskog željeza, a injekcija lipopolisaharida inducirala je izraziti porast IL-6 koji je dosegao maksimum nakon četiri sata i pratio ga je porast koncentracije hepcidina i hipoferemija (129).

Sve eukariotske i prokariotske stanice trebaju željezo da bi se dijelile. Kontrola nad homeostazom željeza vrlo je važna za interakciju između domaćina i patogena zbog činjenice

da željezo ima centralnu ulogu u određenim metaboličkim procesima, kako eukariotskih, tako i prokariotskih stanica. Ono je važno za proliferaciju i patogenost mikroorganizama, a utječe i na plastičnost imunosnih stanica i urođeni imunosni odgovor. Dok su mikroorganizmi razvili niz načina za preuzimanje željeza iz okoliša, organizam domaćina odgovara moduliranjem homeostaze željeza kako bi ovaj element učinio manje dostupnim (147).

Regulacija hepcidina anemijom i eritroidnim faktorima

Većina dnevnih potreba za željezom koristi se za sintezu hemoglobina u prekursorima eritrocita, stoga je bilo logično pretpostaviti da eritropoetska aktivnost može biti uključena u regulaciju sistemske homeostaze željeza. U istraživanju provedenom na miševima supresija eritropoeze zračenjem i posttransfuzijska policitemija, dovela je do izrazitog porasta hepcidina (148). U anemiji i hipoksiji raste koncentracija eritropoetina, hormona koji stimulira eritropoezu. Istovremeno, ekspresija hepcidina se smanjuje omogućavajući brzu mobilizaciju željeza iz retikuloendotelnih stanica kao i povećanu apsorpciju željeza iz crijeva da bi se prekursori eritrocita u koštanoj srži opskrbili dovoljnom količinom željeza (149). Nekoliko istraživanja je pokazalo da supresiju hepcidina ne posreduje izravno anemija, nego da je posredovana povećanom eritropoetskom aktivnošću (148, 150). Istraživanje ne miševima je pokazalo da hemoliza i anemija smanjuju ekspresiju hepcidina samo ukoliko je eritropoeza funkcionalna, dok supresija eritropoeze čak i uz jaku anemiju ne vodi do smanjene ekspresije hepcidina (148). Autori su zaključili da je ekspresija hepcidina regulirana dinamikom korištenja željeza za eritropoezu na što ukazuju i neka istraživanja kod ljudi (151). Signali koji reguliraju ekspresiju hepcidina hijerarhijski su uređeni. Kod bolesti koje prati neučinkovita eritropoeza, kao što su talasemije, izrazito stimulirana eritropoeza nadvladava stimulaciju ekspresije hepcidina signalom statusa željeza te dolazi do nakupljanja ovog elementa (152).

U regulaciji hepcidina eritropoezom vjerojatno posreduju signalne molekule koje stvara koštana srž: eritroferon, GDF15 (eng. growth differentiation factor 15) i TWSG1 (eng. twisted gastrulation protein homologe 1) (120, 128, 130). Eritroferon je nedavno identificiran hormon koji posreduje u supresiji hepcidina. Eritroferon stvaraju eritroblasti kao odgovor na djelovanje eritropoetina. GDF15 stvaraju eritroidni prekursori u kasnom stadiju sazrijevanja. Kod bolesnika koji boluju od β-talasemije pokazana je iznimno visoka koncentraciju ovog faktora u serumu koja je korelirala s razinom sTfR, eritropoetina i feritina. Međutim, kod *Gdf15*$^{-/-}$ miševa flebotomija je izazvala supresiju sinteze hepcidina usporedivu s onom u

kontrolnoj skupini miševa ukazujući da GDF15 nije nužan za fiziološku supresiju hepcidina (153). TWSG1 je protein koji veže BMP, a stvaraju ga eritroblasti u ranijem stadiju diferencijacije nego GDF15, ali i njegova uloga u regulaciji hepcidina nije još u potpunosti razjašnjena.

Regulacija hepcidina hipoksijom

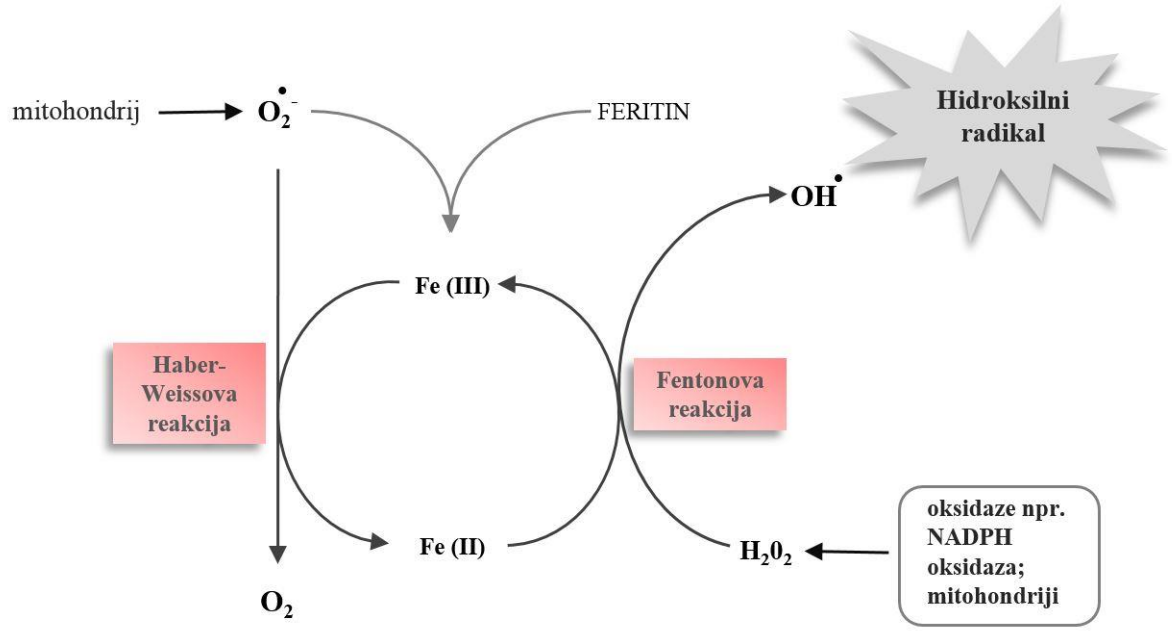
Utjecaj hipoksije na metabolizam željeza potvrđen je u nizu istraživanja. Metabolizam željeza i kisika usko su povezani. Naime, kisik regulira IRP, a mRNA HIF-2α sadrži IRE u 5´-UTR. Druga poveznica između metabolizma željeza i kisika je regulacija hepcidina hipoksijom. Transkripcija gena za hepcidin značajno je potisnuta u uvjetima hipoksije, ali još uvijek nije razjašnjeno da li hipoksija inhibira transkripciju *Hamp* gena izravno ili neizravno. Istraživanje Wilkinson i suradnika pokazalo je da delecija gena za IRP1 vodi do izrazitih poremećaja eritropoeze i sistemske homeostaze željeza koje su ovisne o HIF-2α. Utjecaj na sistemsku homeostazu željeza posljedica je supresije hepcidina koja nastaje zbog indukcije sinteze EPO-a posredovane HIF-2α i posljedične stimulacije eritropoeze (154).

In vivo istraživanja na zdravim dobrovoljcima pokazala su da izlaganje hipoksičnim uvjetima vodi do supresije hepcidina. Relativno kasno snižavanje koncentracije hepcidina nakon izlaganja hipoksiji ukazuje da bi u regulaciju hepcidina mogli biti uključeni neki topivi faktori. Nadalje, pokazalo se da stimulacija kulture HuH-7 stanica sa serumom hipoksičnih osoba, ali ne i normoksičnih osoba inhibira ekspresiju hepcidina (155). Istraživanje koje je ispitivalo modulaciju sinteze hepcidina tijekom eritropoeze inducirane hipoksijom *in vivo* u sklopu HIGHCARE projekta pokazalo je da se koncentracija serumskog feritina značajno snižava vrlo brzo nakon izlaganja hipoksiji (151). Budući da je u svim fazama istraživanja koncentracija hepcidina bila povezana s feritinom autori su zaključili da na ekspresiju hepcidina vjerojatno utječe sama dinamika korištenja željeza. Prema istraživanju Sonnweber i suradnika supresija hepcidina posredovana hipoksijom povezana je s PDGF-BB (eng. platelet derived growth factor-BB) (156)

Supresija sinteze hepcidina u hipoksiji može biti posredovana HIF-om (157, 158). Miševi s delecijom *Hif1α* u jetri nisu pokazivali supresiju gena za hepcidin kao odgovor na nedostatak željeza i hipoksiju za razliku od kontrolne skupine miševa (158). Nadalje, hipoksija povećava razinu mRNA furina putem HIF1α u HepG2 i Hepa-1 (mišjim hepatoma) stanicama. Furin je proteaza koja kida HJV pri čemu nastaje sHJV koji je antagonist BMP-SMAD regulacijskog puta (159).

1.1.8. Željezo i oksidacijski stres

Željezo kao prijelazni metal ima svojstvo vezanja liganda kao i sposobnost primanja i otpuštanja elektrona pri čemu prelazi iz reduciranog u oksidirano stanje (4). Ono se u organizmu nalazi u dva reverzibilna redoks stanja: reduciranom Fe(II) i oksidiranom Fe(III). Kod fizioloških koncentracija kisika stabilno redoks stanje željeza u većini bioloških kompleksa je Fe(III) (29). Oksido-redukcijske reakcije igraju nezaobilaznu ulogu u metabolizmu željeza jer samo reducirani oblik željeza može biti supstrat membranskih transportera, transporta željeza u skladišni protein feritin kao i oslobađanja iz feritina i ugradnje u molekulu hema (29, 72). Međutim, sposobnost željeza da sudjeluje u oksido-reduktivnim reakcijama čini ovaj element i potencijalno toksičnim za organizam. Redukcija jednog elektrona O_2 katalizirana Fe(II) rezultira stvaranjem superoksidnog aniona koji dalje vodi slijed dobro poznatih Haber-Weissovih i Fentonovih reakcija u kojima se stvaraju reaktivne vrste kisika (ROS) koje mogu oštetiti makromolekule poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Slika 7) (29).



Slika 7. Haber-Weissova i Fentonova reakcija koriste slabo vezano željezu u katalitičkom ciklusu u kojem se stvara vrlo štetan hidroksilni radikal. Slabo vezano željezo može se osloboditi i razgradnjom hema i drugih molekula koje sadrže željezo. Preuzeto i prilagođeno prema Kell DB i suradnicima (160).

ROS je termin koji uključuje različite slobodne radikale kisika kao što su superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^-), ali i derivate kisika koji ne sadrže nespareni elektron

kao što je vodikov peroksid (H_2O_2). Stvaranje ROS-a je integralni dio metabolizma, a ima ulogu u fiziološkim procesima uključenim u stvaranje energije, regulaciji staničnog rasta, fagocitozi, staničnoj signalizaciji i sintezi važnih molekula poput hormona i enzima (161).

1.2. KRONIČNA OPSTRUKCIJSKA PLUĆNA BOLEST

1.2.1. Definicija KOPB-a

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je kronična bolest pluća koju karakterizira progresivna opstrukcija dišnih putova koja nastaje kao rezultat neprimjerenog upalnog odgovora na inhalirane čestice i plinove te vodi do trajnih morfoloških i funkcionalnih promjena u plućnom parenhimu. KOPB je prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije četvrti vodeći uzrok smrti u svijetu (162). Iako se pušenje smatra najvažnijim rizičnim čimbenikom za razvoj bolesti, nije i jedini. Epidemiološka istraživanja su pokazala da se bolest može razviti i kod značajnog broja nepušača (163). Osim pušenja rizične čimbenike predstavljaju: izloženost zagađenom zraku, profesionalna izloženost dimu ili prašini, učestale infekcije respiracijskog sustava tijekom djetinjstva, kronična astma, tuberkuloza, loši socio-ekonomski uvjeti. KOPB je rezultat kumulativne izloženosti rizičnim čimbenicima, stoga se predviđa da će prevalencija ove bolesti u idućim desetljećima rasti uslijed kontinuirane izloženosti rizičnim čimbenicima i starenjem svjetske populacije, te da će KOPB postati jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu (162, 164).

Kronično ograničenje protoka zraka karakteristično za KOPB uzrokovano je bolešću malih dišnih putova (opstruktivni bronhiolitis) i destrukcijom parenhima (emfizem) koji u različitoj mjeri doprinose bolesti kod pojedinog bolesnika. Kronični upalni odgovor može inducirati destrukciju parenhima, te rezultirati nastankom emfizema ili spriječiti normalni popravak rezultirajući fibrozom. Patološke promjene karakteristične za KOPB nađene su u dišnim putovima, plućnom parenhimu i krvnim žilama pluća (162). Progresivni tijek bolesti kompliciran je nastankom sistemskih posljedica i komorbiditeta, te se KOPB više ne smatra bolešću ograničenom na pluća. Najznačajnije sistemske posljedice su disfunkcija mišića, osteoporoza, malnutricija, metabolički sindrom, kardiovaskularni poremećaji, anksioznost i depresija, karcinom pluća koje značajno utječu na težinu i kliničku sliku bolesti, te smanjuju kvalitetu života bolesnika (165).

Klinička dijagnoza KOPB-a postavlja se na temelju simptoma (kašalj, produkcija sputuma, dispneja) i povijesti izloženosti rizičnim čimbenicima. Za potvrdu dijagnoze potrebno je ispitati funkciju pluća spirometrijom. Vrijednost omjera forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi (FEV_1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) manja od 0,7 nakon primjene bronhodilatatora potvrđuje dijagnozu KOPB-a. Globalna inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (engl. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease,*

GOLD) temeljem vrijednosti FEV_1 izmjerene nakon primjene bronhodilatatora klasificira bolesnike u četiri skupine obzirom na ograničenje protoka zraka (Tablica 4) (162).

Tablica 4. Klasifikacija težine ograničenja protoka zraka u KOPB-u (GOLD 2015.g.)

Klasifikacija težine ograničenja protoka zraka u KOPB-u (na temelju FEV_1 nakon primjene bronhodilatatora), kod bolesnika s $FEV_1/FVC < 0,70$	
GOLD 1 (blagi)	$FEV_1 \geq$ 80 % predviđenog
GOLD 2 (umjereni)	50 % $\leq FEV_1 <$ 80 %
GOLD 3 (teški)	30 % $\leq FEV_1 <$ 50 %
GOLD 4 (vrlo teški)	$FEV_1 <$ 50 %

1.2.2. Patogeneza KOPB-a

Središnje mjesto u patogenezi KOPB-a ima upala, no međutim, važnu ulogu igraju i oksidacijski stres, te neravnoteža aktivnosti proteaza i antiproteaza, a ti su patofiziološki mehanizmi međusobno povezani.

Upala respiracijskog sustava kod bolesnika s KOPB-om modificirani je upalni odgovor respiratornog trakta na kronične iritanse kao što je dim cigarete. Mehanizam ovakve amplificirane upale nije u potpunosti razjašnjen, ali bi mogao biti barem djelomično genetski određen (166, 167). Upalni procesi uključuju različite tipove stanica poput neutrofila, makrofaga, limfocita T i veliki broj proupalnih citokina kao što su TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, C-reaktivni protein (CRP) te fibrinogen. Upala u KOPB-u nije ograničena samo na pluća, već je razina medijatora upale osim u sputumu povećana i u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om. Poznato je da je intenzitet sistemske upale izravno proporcionalan težini bolesti i pojačava se tijekom egzacerbacije (168-170). Smanjivanje plućne funkcije povezano je s pokazateljima upale kao što su broj neutrofila u sputumu, koncentracija mijeloperoksidaze, fibrinogena, IL-6 i CRP-a. Upala u plućnom odjeljku vodi do strukturnih promjena u plućnom tkivu: fibroze, emfizema, remodeliranja krvožilja u plućima, a smatra se da je sistemska upala uzrok većine izvanplućnih posljedica KOPB-a (171).

Upala u KOPB-u nije entitet za sebe, već je usko povezana s oksidacijskim stresom i neravnotežom proteaza i antiproteaza. Oksidacijski stres igra važnu ulogu u patogenezi

KOPB-a izravnim oštećenjem pluća, ali i posredno, pojačavanjem štetnog djelovanja ostalih mehanizama (172). Respiracijski sustav je izravno izložen vanjskom okolišu i visokim koncentracijama kisika, te je stoga glavna meta oštećenja uzrokovanog oksidansima egzogenog, ali i endogenog porijekla. U respiracijskom sustavu glavni izvor oksidansa su alveolarni makrofagi, epitelne, endotelne i upalne stanice kao što su neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti. Egzogeni oksidansi kao što su ozon, dušikov dioksid i sumporov dioksid potiču iz zagađenog zraka i dima cigareta koji sadrži oko 10^{14} slobodnih radikala po udisaju (172). U fiziološkim uvjetima ravnotežu oksidansima čini sustav antioksidansa koji dijelimo na neenzimatske antioksidanse (vitamin C, vitamin E, beta karoten i reducirani glutation) i enzimatske antioksidanse (glutation reduktaza, glutation peroksidaza, superoksid-dismutaza, katalaza). Poremećena ravnoteža između oksidansa i antioksidansa kao sustava obrane naziva se oksidacijski stres (173). Pušenje kao i sama upala, može dovesti do oksidacijskog stresa (174). Različiti pokazatelji oksidacijskog stresa nađeni su u povećanim količinama u plućima, kondenzatu izdahnutog zraka i urinu pušača i bolesnika s KOPB-om uključujući vodikov peroksid, dušikov oksid i produkte lipidne peroksidacije. Posljedice oksidacijskog stresa povezane s patogenezom KOPB-a uključuju: oksidacijsku inaktivaciju antiproteaza, ozljedu epitela dišnih putova, apoptozu, povećano nakupljanje neutrofilnih granulocita u mikrovaskulaturi pluća i pojačanu ekspresiju gena proupalnih medijatora. Oksidacijski stres ima ulogu u pojačavanju upale kod pušača i bolesnika s KOPB-om, aktivacijom redoks-osjetljivih transkripcijskih faktora kao što su nuklearni faktor-κB, aktivirajući protein–1 i promjenama u remodeliranju kromatina koje reguliraju gene upalnih medijatora i ekspresiju gena antioksidacijskog sustava (175, 176).

Poremećaj ravnoteže proteaza i antiproteaza u KOPB-u može nastati uslijed pojačanog stvaranja i/ili aktivnosti proteaza, te smanjenog stvaranje i/ili inaktivacije antiproteaza. Proteaze koje su uključene u patogenezu KOPB-a uključuju one koje stvaraju neutrofili (elastaza, katepsin G, proteinaza 3) i makrofagi (katepsin B, L, S i različite matriksne metaloproteinaze). Smatra se da važnu ulogu u patogenezi KOPB-a imaju α1-antitripsin, sekretorni inhibitor leukoproteinaza i tkivni inhibitori matriksnih metaloproteinaza. Neutrofilna elastaza ne doprinosi samo destrukciji parenhima, već snažno potiče mukoznu sekreciju i hiperplaziju mukoznih žlijezda (177). Proteaze kidaju komponente izvanstaničnog matriksa, vlakna elastina i kolagena pri čemu nastaju fragmenti ovih molekula. Pokazalo se da ove molekule djeluju kemotaktično na monocite i neutrofile, podržavaju daljnje nakupljanje ovih stanica i oštećenje pluća. Oksidacijski stres je usko povezan s poremećenom ravnotežom

proteaza i antiproteaza. Naime, oksidansi mogu potencirati učinak proteaza aktivacijom ovih enzima, ali *in vitro* istraživanja su pokazala da oksidacija metioninskog ostatka u aktivnom mjestu α1-antitripsina rezultira smanjenjem njegove aktivnosti (178).

1.2.3. Željezo i KOPB

Izvori oksidacijskog stresa u KOPB-u proizlaze i iz povećanog opterećenja inhalacijskim oksidansima kao i povišenim količinama ROS-a kojeg stvaraju upalne stanica kao i imunosne te epitelne stanice dišnih putova (23). Uz to, zbog konstantnog kontakta pluća sa zrakom, ona su dodatno izložena katalitički aktivnom željezu.

Niz istraživanja je ukazalo da oksidacijski stres kataliziran željezom ima ulogu u patogenezi KOPB-a (179). Pušenje uzrokuje deponiranje čestica u plućima uz odgovarajući porast tkivnog željeza. U usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima, pušači koji boluju od KOPB-a imaju povećanu koncentraciju željeza i feritina te smanjenu koncentraciju transferina u bronhoalveolarnom lavatu (180). Istraživanje Ghio i suradnika pokazalo je da dim cigareta potiče stvaranje ROS-a mehanizmom ovisnim o željezu, te da čestice dima cigareta utječu na homeostazu željeza u plućima, ali i sistemsku homeostazu (181).

Pluća osobe koja diše normalnom frekvencijom izložena su količini od 10 μg željeza dnevno. Plućne bolesti kao što su infektivna upala pluća, KOPB, cistična fibroza, sarkoidoza, intersticijska bolest pluća, akutni respiracijski distres sindrom i bronhogeni karcinom uključuju istovjetni poremećaj metabolizma željeza i oksidacijski stres u donjim dijelovima respiracijskog sustava. Istraživanja su također pokazala da neutrofilna elastaza može razgraditi feritin, transferin i laktoferin i tako povećati razinu slobodnog željeza koje može posredovati niz reakcija koje kataliziraju pretvorbu superoksidnog aniona i/ili vodikovog peroksida otpuštenog tijekom neutrofilnog respiracijskog praska u citotoksični hidroksilni radikal (182, 183).

Stanice respiracijskog tkiva pohranjuju željezo u katalitički manje aktivnom obliku. Za pohranjivanje željeza epitelne stanice pluća koriste iste proteine koji posreduju apsorpciju željeza u duodenalnim enterocitima, ali je regulacija njihove ekspresije modificirana u cilju detoksifikacije ovog elementa. Mehanizam pohranjivanja željeza kod svih živih bića zahtjeva njegovo skladištenje u obliku feritina. Pohranjivanje u obliku feritina ograničava kapacitet željeza u kataliziranju stvaranja slobodnih radikala i ima antioksidacijsku ulogu. Koncentracija feritina u tekućini koja obavija pluća je ekstremno visoka što izravno odražava interakciju ovog tkiva sa željezom iz okoliša. U tekućini koja oblaže pluća dokazana je

prisutnost značajne količine transferina. Ukoliko epitelne stanice i alveolarni makrofagi ne mogu uspostaviti ravnotežu u stanjima povećane dostupnosti željeza i oksidacijskog stresa, metal se može transportirati i metabolizirati u neutrofilima. Neutrofili otpuštaju sekundarne granule koje sadrže laktoferin koji ima visoki afinitet vezanja za Fe^{3+} i prenosi se u makrofage i respiracijske epitelne stanice za pohranjivanje u feritinu (184).

1.2.4. Egzacerbacija KOPB-a

Tijek KOPB-a praćen je i nastankom akutnih pogoršanja bolesti - akutnih egzacerbacija KOPB-a (AEKOPB) varijabilne učestalosti i težine. AEKOPB se definira kao događaj u prirodnom tijeku bolesti karakteriziran promjenom u bazičnom stupnju dispneje, kašlja i/ili sputuma iznad normalnih dnevnih varijacija, koji su akutnog nastanka i zahtijevaju trajnu promjenu u uobičajenom liječenju bolesnika s KOPB (162). Egzacerbaciju karakterizira intenzivnija upala dišnih putova, ali i znatno pogoršanje općeg stanja uz slabljenje plućne funkcije. Obzirom na nedostatak pouzdanih laboratorijskih pokazatelja, dijagnoza egzacerbacije postavlja se na temelju simptoma i kliničke slike: pogoršanje dispneje, pojačan i učestaliji kašalj, povećana produkcija sputuma i/ili promjena izgleda sputuma. Iako se kod jedne trećine egzacerbacija uzrok ne može ustanoviti, respiracijske infekcije glavni su rizični čimbenik egzacerbacija. Tri četvrtine slučajeva egzacerbacije uzrokovano je infektivnim agensom, dok se dodatnim čimbenicima smatraju izloženost alergenima ili iritansima (pušenje, onečišćenje zraka) ili pogoršanje pridruženih bolesti (185).

Bolesnike s KOPB-om može se podijeliti na one s rijetkim (manje od dvije na godinu) i čestim egzacerbacijama (tri i više). Egzacerbacije su češće kod bolesnika s teškim KOPB-om, iako su neki bolesnici skloni egzacerbacijama bez obzira na težinu bolesti (186, 187). U usporedbi s bolesnicima koji rjeđe imaju egzacerbacije, oni s češćim egzacerbacijama tijekom stabilne faze bolesti imaju višu razinu upalnih markera što ukazuje na povezanost između razine upale i učestalosti egzacerbacija. AEKOPB su povezane s progresijom bolesti, rizikom od ponavljanih egzacerbacija, razvojem komplikacije, reduciranom fizičkom aktivnošću, smanjenjem plućne funkcije i pogoršanjem sveukupnog zdravstvenog stanja, te povećanim rizikom od smrtnog ishoda (188).

Plućna funkcija bolesnika s češćim egzacerbacijama u pravilu se, do pojave nove egzacerbacije, ne vraća na početnu razinu što uzrokuje njezino progresivno slabljenje. Tijekom egzacerbacije upalni procesi jačaju, kako u plućima, tako i sistemski. Serumski pokazatelji upale čija se koncentracija povećava u krvi tijekom egzacerbacije u odnosu na

stabilnu fazu bolesti uključuju veliki broj molekula: CRP, IL-8, TNFα, leptin, endotelin-1, eozinofilni kationski protein, mijeloperoksidazu, fibrinogen, IL-6, leukotrien E4 i leukotrien B4 (189).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U KOPB-u je prisutan niz čimbenika koji djeluju na hematopoetski sustav od kojih neki djeluju stimulirajuće, a neki inhibirajuće. Iako se KOPB tradicionalno povezuje s pojavom sekundarne policitemije učestalost anemije kod ove skupine bolesnika kreće se od 7,5 do 34 %, dok je učestalost policitemije oko 6 % (190). Prisutna anemija dodatno smanjuje oksigenaciju tkiva, pogoršava dispneju i toleranciju napora kod ovih bolesnika (191). Istraživanje Kollerta i suradnika je pokazalo da kod bolesnika koji boluju od KOPB-a i kroničnog zatajenja pluća, a na terapiji su neinvazivnom mehaničkom ventilacijom i dugotrajnom terapijom kisikom (engl. long term oxygen therapy, LTOT) viša koncentracija hemoglobina povezana s boljim dugoročnim preživljavanjem (192).

Iako ima neke elemente anemije kronične bolesti kao što je perzistentna sistemska upala i rezistencija na eritropoetin, uzrok nastanka anemije kod bolesnika s KOPB-om nije u potpunosti razjašnjen (193, 194). AKB ima više uzroka, nastaje kao posljedica skraćenog životnog vijeka eritrocita, inhibicije koštane srži proupalnim citokinima, rezistencije na eritropoetin i poremećene homeostaze željeza. Glavni posrednik poremećenog recikliranja željeza u AKB-u je jetreni hormon hepcidin. IL-6 je ključni čimbenik koji potiče sintezu hepcidina tijekom upale što uzrokuje zadržavanje željeza u stanicama i hipoferemiju, te tako ograničava dostupnost ovog elementa patogenima (129, 141). Ograničena dostupnost željeza limitirajući je čimbenik sinteze hemoglobina te rezultira razvojem anemije pa se hepcidin smatra medijatorom anemije kronične bolesti. Anemija i hipoksija potiču sintezu EPO-a, hormona koji stimulira eritropoezu, ali i smanjuju ekspresiju hepcidina što omogućava brzu mobilizaciju željeza iz retikulo-endotelnih makrofaga i povećanu apsorpciju u duodenalnim enterocitima kako bi se željezom opskrbili prekursori eritrocita u koštanoj srži (119). Signali koji reguliraju ekspresiju hepcidina u stanicama jetre hijerarhijski su uređeni. Kod bolesti čija je značajka neučinkovita eritropoeza, kao što su talasemije, dominira signal eritropoetskog tkiva koji smanjuje sintezu hepcidina unatoč dovoljnim rezervama željeza u organizmu dovodeći do nakupljanja željeza u organizmu (152).

Poznato je da je intenzitet sistemske upale izravno proporcionalan težini bolesti i pojačava se tijekom egzacerbacije (168-170). Budući da serumska koncentracija hepcidina raste u upali i smanjuje se u hipoksiji i anemiji, razina hepcidina u KOPB-u mogla bi biti kontrolirana složenom mrežom signala koji imaju suprotan učinak na njegovu ekspresiju. Praćenje bolesnika s KOPB-om od faze egzacerbacije bolesti do stabilne faze može biti dobar

model za ispitivanje utjecaja upale, hipoksije i statusa željeza na ekspresiju hepcidina u KOPB-u, te njihovog učinka na hematološke parametre kod ovih bolesnika. Egzacerbacija KOPB-a predstavlja stanje povećane sistemske upale uz istovremeno prisutno pogoršanje plućne funkcije koje može rezultirati hipoksijom, stoga egzacerbacija omogućava procjenu utjecaja sistemskog upalnog procesa i hipoksije na regulaciju hepcidina i eritropoezu kod bolesnika s KOPB-om. Hipoksija prisutna kod određenog broja bolesnika mogla bi nadvladati učinak IL-6, to jest uzrokovati supresiju sinteze ovog jetrenog hormona u cilju osiguravanja dovoljne količine željeza koštanoj srži. Neka istraživanja pokazuju da je prevalencija anemije u teškom KOPB-u manja nego u blažim oblicima bolesti, vjerojatno jer hipoksemija prisutna u težim oblicima bolesti stimulira eritropoezu te moguće nadvladava utjecaj sistemske upale na eritropoezu. Ovime se objašnjava i snižena prevalencija anemije ustanovljena kod bolesnika koji su kandidati za LTOT (195).

Regulacija sinteze hepcidina u KOPB-u slabo je ispitana. Duru i suradnici su ispitivali razinu prohepcidina, prohormona hepcidina u stabilnoj fazi KOPB-a i pokazali da je njegova razina snižena u skupini bolesnika s teškim KOPB-om u u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnoj skupini, te da u toj skupini bolesnika razina hepcidina pozitivno korelira s parcijalnim tlakom kisika (PaO_2) i zasićenjem hemoglobina kisikom (SaO_2) (196). Kompleksna mreža staničnih i izvanstaničnih signala regulira metabolizam željeza u plućima kako bi održala njegovu homeostazu. U plućima ekspresiju hepcidina pokazuju epitelne stanice dišnih putova koju induciraju interferon gama i IL-6 te alveolarni makrofagi (197) (198). U makrofagima je ekspresija hepcidina prije svega regulirana medijatorima upale i infektivnim agensima i njegova ekspresija važnija je na lokalnoj nego na sistemskoj razini, te doprinosi obrani od infekcije, modulira upalni proces, a mogla bi utjecati na razinu oksidacijskog stresa omogućavajući zadržavanje željeza u makrofagima u kemijski inertnijoj formi, u obliku feritina (197).

Uz kroničnu upalu, oksidacijski stres je važna značajka u patogenezi KOPB-a. Izvori oksidacijskog stresa proizlaze iz povećanog opterećenja inhalacijskim oksidansima kao i povišenim količinama ROS-a koje stvaraju upalne stanica kao i imunosne te epitelne stanice dišnih putova (174). Uz to, zbog konstantnog kontakta pluća sa zrakom, ona su dodatno izložena katalitički aktivnom željezu. Željezo može pojačati oksidacijski stres zbog svoje sposobnosti da potiče stvaranje ROS-a. Istraživanje Ghio i suradnika pokazalo je da dim cigareta potiče stvaranje ROS-a mehanizmom ovisnim o željezu (180).

2.1. Cilj i hipoteze istraživanja

Cilj ovoga rada je ispitati povezanost između promjena u koncentraciji serumskog hepcidina i čimbenika koji ga reguliraju kod bolesnika s KOPB-om, u fazi akutne egzacerbacije, nakon razrješenja akutne krize - u rezoluciji i u stabilnoj fazi bolesti da bi se ispitalo kako ovi čimbenici utječu na koncentraciju hepcidina i osiguravanje dovoljne opskrbe željezom neophodnim za eritropoezu.

Specifični ciljevi:

- Ispitati da li je koncentracija hepcidina promijenjena u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na skupinu zdravih ispitanika te da li se koncentracija hepcidina mijenja u AEKOPB-u.
- Ispitati razinu sistemske upale u egzacerbaciji, rezoluciji i stabilnoj fazi KOPB-a određivanjem pokazatelja sistemske upale: IL-6, CRP-a, fibrinogena, broja leukocita i broja neutrofilnih leukocita te ispitati utjecaj upale na koncentraciju hepcidina.
- Ispitati mogući učinak hipoksije na koncentraciju hepcidina praćenjem pokazatelja hipoksije: PaO_2 i $SatO_2$ u egzacerbaciji, rezoluciji i stabilnoj fazi bolesti.
- Ispitati povezanost serumske koncentracije hepcidina s pokazateljima statusa željeza određivanjem koncentraciju serumskog željeza, TIBC-a, feritina i Tsat-a.
- Ispitati povezanost hepcidina s pokazateljima eritropoeze određivanjem apsolutnog broja retikulocita, koncentracije eritropoetina i sTfR-a.
- Ispitati utjecaj hepcidina na koncentraciju hemoglobina u AEKOPB-u i stabilnoj fazi bolesti.

Hipoteza istraživanja:

- Koncentracija hepcidina u serumu bolesnika s KOPB-om promijenjena je u odnosu na kontrolnu skupinu i mijenja se tijekom AEKOPB-a.
- Na sintezu hepcidina u jetri i koncentraciju u serumu bolesnika s KOPB-om utječu upala i/ili hipoksija.
- Serumska koncentracija hepcidina povezana je s promjenom koncentracije hemoglobina u egzacerbaciji i stabilnoj fazi bolesti.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Plan istraživanja

U ovom istraživanju parametri su longitudinalno praćeni u tri vremenske točke: u fazi egzacerbacije, u fazi rezolucije i u stabilnoj fazi bolesti. Rezolucija AEKOPB-a definirana je kao završeni tretman kortikosteroidima i antibioticima, vraćanje simptoma na razinu prije egzacerbacije bez potrebe za povećanom dozom bronhodilatatora. Stabilna faza je definirana kao odsutnost značajnih promjena simptoma veća od očekivane dnevne varijacije bez potrebe za pojačanim tretmanom minimalno 12 tjedana nakon rezolucije (194).

U sve tri vremenske točke kod bolesnika s KOPB-om određivani su hematološki parametri krvne slike (broj leukocita, neutrofilnih granulocita i koncentracija hemoglobina), serumska koncentracija hepcidina i čimbenika koji reguliraju ekspresiju hepcidina u jetri. Kao pokazatelji statusa željeza mjereni su koncentracija željeza, nezasićeni kapacitet željeza (UIBC), ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC) i feritin u serumu; kao pokazatelji eritropoetske aktivnosti određen je broj retikulocita (Rtc), koncentracija topivih transferinskih receptora (sTfR) i koncentracija regulatornog hormona EPO-a; koncentracija IL-6, CRP-a i fibrinogena, te broj leukocita određeni su kao pokazatelji sistemske upale. Svim bolesnicima određeni su parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi i zasićenje hemoglobina kisikom za procjenu eventualno prisutne hipoksije. Za procjenu oksidacijskog stresa u sve tri vremenske točke mjerena je koncentracija tiolnih skupina i antioksidacijskih molekula: mokraćne kiseline, albumina, te ukupnog i direktnog bilirubina.

Svim bolesnicima u prvom uzorku seruma (kod prijema) određena je koncentracija kreatinina i Cockroft-Gaultovom formulom izračunata glomerularna filtracija (engl. estimated glomerular filtration rate, eGFR) kako bi se isključila bolest bubrega, te aktivnost jetrenih enzima aspartat-amino transferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP), da bi se isključila bolest jetara budući da smanjena bubrežna funkcija i jetrene bolesti utječu na razinu hepcidina. Svim bolesnicima je u fazi rezolucije bila napravljena spirometrija, izračunat indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI) i Charlsonov indeks komorbiditeta.

3.2. ISPITANICI

Skupina pacijenata s KOPB-om

U istraživanje je bilo uključeno 40 bolesnika koji imaju postavljenu dijagnozu KOPB-a prema GOLD kriterijima, te im je dijagnosticirana AEKOPB kod prijema u bolnicu (162). AEKOPB utvrđena je na temelju pogoršanja simptoma bolesti (pogoršanje respiracijskih tegoba, izražena dispneja, iskašljavanje veće količine gnojnog sputuma, respiracijskom insuficijencijom, slabošću, nesanicom, umorom, depresijom te konfuzijom) i pogoršanja stanja bolesnika u odnosu na stabilnu fazu bolesti i iznad uobičajenih dnevnih varijacija simptoma (162).

Iz istraživanja su bili isključeni svi bolesnici koji imaju poremećaje ili stanja koji sami po sebi mogu utjecati na hematološke parametre ili na koncentraciju hepcidina.

Kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja:

- AEKOPB, terapija oralnim ili parenteralnim kortikosteroidima u posljednja tri mjeseca
- druge bolesti pluća
- druge kronične upalne bolesti
- bolest jetre
- smanjena bubrežna funkcija (eGFR < 60 ml/min)
- maligne bolesti
- operativni zahvat u posljednja tri mjeseca
- transfuzija krvi u posljednja tri mjeseca
- terapija preparatima željeza, folne kiseline ili vitaminom B_{12}

Kontrolna skupina

U kontrolnu skupinu je uključeno trideset zdravih ispitanika podudarnih po dobi i spolu bolesnicima s KOPB-om, koji su prošli redovni sistematski pregled, te nisu pokazivali

znakove akutnih ni kroničnih stanja. Za procjenu plućne funkcije svim ispitanicima je napravljena spirometrija. Temeljem normalnih spirometrijskih nalaza dobrovoljci su uključeni u istraživanje kao ispitanici kontrolne skupine.

3.3. METODE

3.3.1. Biokemijski i hematološki parametri

Uzorci krvi za analizu uzeti su kod svih bolesnika kojima je dijagnosticirana AEKOPB-a prije početka terapije, a u stabilnoj fazi i fazi rezolucije uzorci krvi uzeti su natašte između 7 i 10 sati. Uzorci krvi za krvnu sliku uzeti na K_2-EDTA analizirani su unutar jednog sata od uzorkovanja. Iz uzorka krvi bez antikoagulansa, neposredno nakon centrifugiranja na 3500 okretaja u minuti tijekom 10 minuta, serum je odvojen od stanica, uzorci su razdijeljeni na alikvote i pohranjeni na -80°C do analize. Uzorci plazme uzete na Na-citrat nakon centrifugiranja na 4000 okretaja u minuti, tijekom 15 minuta neposredno nakon centrifugiranja odvojeni su od stanica i alikvotirani, te pohranjeni na -80°C do analize.

Koncentracija željeza, urata, albumina, ukupnog i direktnog bilirubina, feritina i TIBC, aktivnost AST, ALT i ALP mjereni su se standardnim laboratorijskim metodama na automatskom analizatoru (Beckman Coulter, AU 680, USA). Rtc i parametri kompletne krvne slike određeni su na hematološkom analizatoru (Siemens, Advia 120, Erlangen, Germany). Koncentracija sTfR određena je nefelometrijski (Siemens, ProSpec, Erlangen, Germany), koncentracija fibrinogena metodom po Claussu na automatskom optičkom koagulometru (Siemens, BCS, Erlangen, Germany). ELISA metodom određena je koncentracija IL-6 (eBioscience, San Diego, CA, USA), hepcidina (DRG International; Marburg, Germany) i EPO (eBioscience, San Diego, CA, USA). SaO_2 i PaO_2 određivani su direktnom potenciometrijom na acidobaznom analizatoru (Gem 3000, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA).

Određivanje tiolnih skupina

Za određivanje tiolnih skupina koristio se Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB). U reakciji DTNB-a s tiolnim skupinama oslobađa se 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i nastaju miješani disulfidi između molekula sa sulfhidrilnom (SH) skupinom i TNB. Reakcija se odvija brzo i stehiometrijski pri čemu jedan mol tiola oslobađa jedan mol TNB-a. TNB u vodenoj sredini pri alkalnom i neutralnom pH ionizira u žuto obojeni anion TNB. Oslobođeni TNB se određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 412 nm.

3.3.2. Ostali postupci

Za procjenu plućne funkcije bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika napravljena je spirometrija. Spirometrija je metoda dinamičkog mjerenja plućnih volumena. Nakon maksimalnog udaha izdahne se brzo i jako i pokuša se iz pluća izdahnuti sav zrak. Pomoću krivulje protoka volumena zraka mjeri se FEV_1, FVC, izračunava Tiffaneu-ov indeks (FEV_1/FVC), ali i niz drugih parametara. Spirometrijsko mjerenje kod bolesnika s KOPB-om napravljeno je nakon primjene kratko-djelujućeg bronhodilatatora prema GOLD smjernicama u stabilnoj fazi bolesti.

U istraživanje su uključeni ispitanici koji nemaju dijagnosticiranu bolest bubrega ni jetre i vrijednostima eGFR>60 ml/min, te vrijednostima aktivnosti jetrenih enzima manjim od trostruke vrijednosti gornje granice referentnog raspona. Svim bolesnicima je u fazi rezolucije napravljena spirometrija, izračunat indeks tjelesne mase i Charlsonov indeks komorbiditeta. Charlsonov indeks komorbiditeta predviđa desetogodišnji rizik od smrtnog ishoda za bolesnike koji imaju veći broj bolesti ili stanja kao što su bolesti srca, AIDS, zloćudne bolesti, dijabetes melitus itd. (ukupno 22 stanja). Svakoj bolesti ili stanju pridružuje se ocjena 1, 2, 3 ili 6 ovisno o riziku od smrti povezanom s tim stanjem. Ocjene se zatim zbrajaju i dobiveni zbroj predviđa rizik od smrti (199).

Svim bolesnicima i ispitanicima kontrolne skupine uzeti su podaci o pušačkim navikama i izračunat je broj pušačkih godina (200). Pušačke godine (engl. *pack-years*) su indeks ukupne izloženosti duhanskom dimu ili ukupni pušački staž. Pušačke godine računaju se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Pušačke godine} = \frac{\text{Broj cigareta dnevno}}{20} \times \text{godine pušenja}$$

3.4. STATISTČKA ANALIZA

Izmjereni rezultati s obzirom na veličinu uzorka i normalnost raspodjele prikazani su odgovarajućim mjerama središnjice i rasapa i to srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom za podatke koji slijede normalnu raspodjelu, a medijanom i interkvartilnim rasponom za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu. Normalnost raspodjele ispitana je Kolmogorv-Smirnovljevim testom. Podaci su obzirom na raspodjelu uspoređivani parametrijskim ili odgovarajućim neparametrijskim testovima. Rezultati varijabli vezanih mjerenja uspoređeni su zavisnim testovima i to parametrijskim ANOVA testom za ponovljena mjerenja (engl. *Repeated measures analysis of variance*) ili Friedmanovim testom, neparametrijskim testom za ponavljana mjerenja. Međusobna povezanost varijabli ispitana je parametrijskim Pearsonovim testom korelacije ili neparametrijskom Spearmanovom korelacijom obzirom na normalnosti raspodjele podataka. Statistički značajne povezanosti (uz $P<0,05$) tumačena je sukladno Coltonovu kriteriju (za $r <0,25$ i $r < -0,25$ kao nepostojanje povezanosti, za $r = 0,25 – 0,50$ i $r= -0,25 – -0,50$ kao slaba do umjerena povezanost, za $r = 0,5 – 0,75$ i $r = -0,5 – -0,75$ kao dobra povezanost, te za $r > 0,75$ i $r < -0,75$ kao izvrsna povezanost). Razlika varijabli između ispitivane i kontrolne skupine ispitana je parametrijskim nezavisnim t-testom ili neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom za nezavisne uzorke. Raspodjela kategoričkih varijabli između skupina uspoređena je hi-kvadrat testom, a između triju vezanih mjerenja Cochranovim Q testom. Statistički značajnima smatrane su sve razlike i povezanosti uz $P<0,05$.

4. REZULTATI

Osnovne karakteristike bolesnika s KOPB-om i ispitanika kontrolne skupine prikazana su u tablici 5. Skupina zdravih ispitanika bila je podudarna sa skupinom bolesnika s KOPB-om obzirom na dob i spol, ali je u kontrolnoj skupini bilo više pušača nego u skupini bolesnika s KOPB-om. U skupini bolesnika s KOPB-om 9 bolesnika je bilo na LTOT-u.

Tablica 5. Demografske karakteristike bolesnika s KOPB-om i ispitanika kontrolne skupine.

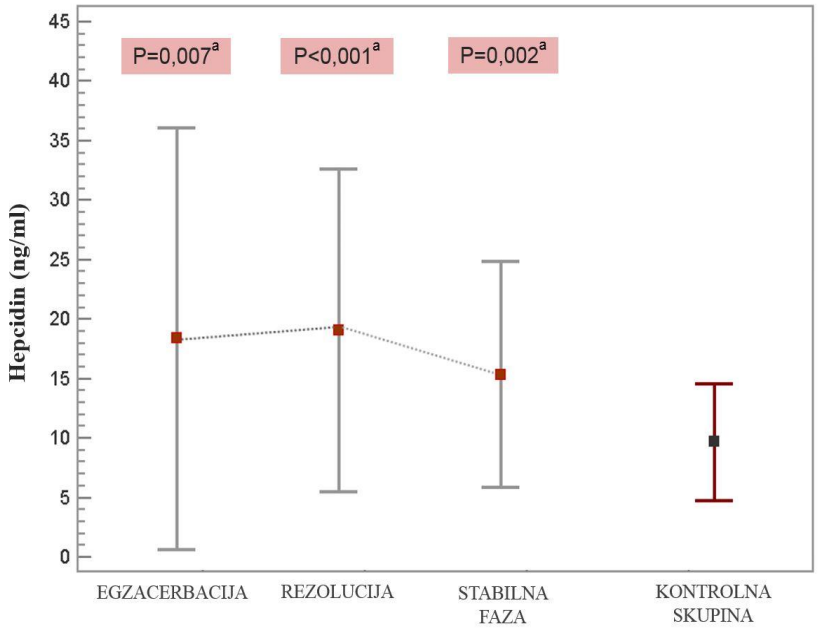
	KOPB skupina	Kontrolna skupina	P vrijednost
N	40	30	
Spol (žene/muškarci)	9/31	6/24	0,800
Starost (godine)	71±8	73±7	0,269
BMI (kg/m^2)	26,1±5,9	27,5±2,3	0,197
Pušačke navike (pušačke godine)	39±18	26±19	0,051
Pušači / bivši /nepušači	**18/16/6**	**3/14/13**	**0,002**
Charlson indeks	2 (1-4)		
FEV_1 (% očekivanog)	**39±19**	**85±15**	**<0,0001**
FEV_1/FVC (%)	**52±14**	**94±9**	**<0,0001**
Klasifikacija bolesnika s KOPB-om prema težini ograničenja protoka zraka (GOLD 2015.)			
Blagi KOPB ($FEV_1 \geq 80$ % očekivanog)			1/40
Umjereni KOPB (50 % ≤ $FEV_1 < 80$ % očekivanog)			6/40
Teški KOPB (30 % ≤ $FEV_1 < 50$ % očekivanog)			17/40
Vrlo teški KOPB ($FEV_1 < 30$ % očekivanog)			16/40

Iako je KOPB često praćen drugim bolestima Charlsonov indeks komorbiditeta bio je relativno nizak (Tablica 5). Pokazalo se da je najviše bolesnika s KOPB-om pobolijevalo od srčane dekompenzacije, šećerne bolesti, ishemijske bolesti srca i hipertenzije. Nizak Charlsonov indeks posljedica je odabranih kriterija za isključivanje iz istraživanja (jetrene bolesti, kronično bubrežno zatajenje, zloćudni tumori, zloćudne hematološke bolesti).

4.1. Longitudinalne vrijednosti hepcidina, pokazatelja upale, statusa željeza, eritropoetske aktivnosti i hemoglobina, te hipoksije u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini

Hepcidin

Serumska koncentracija hepcidina kod bolesnika s KOPB-om bila je povećana u egzacerbaciji, rezoluciji kao i u stabilnoj fazi bolesti u odnosu na skupinu zdravih ispitanika, ali istraživanjem nije dokazano postojanje razlike između serumske koncentracije hepcidina u egzacerbaciji u odnosu na stabilnu fazu KOPB-a. Podaci pokazuju veći rasap vrijednosti hepcidina u fazi egzacerbacije, te je iz grafa uočljivo da je kod određenog broja bolesnika došlo do snižavanja koncentracije hepcidina (Slika 8).

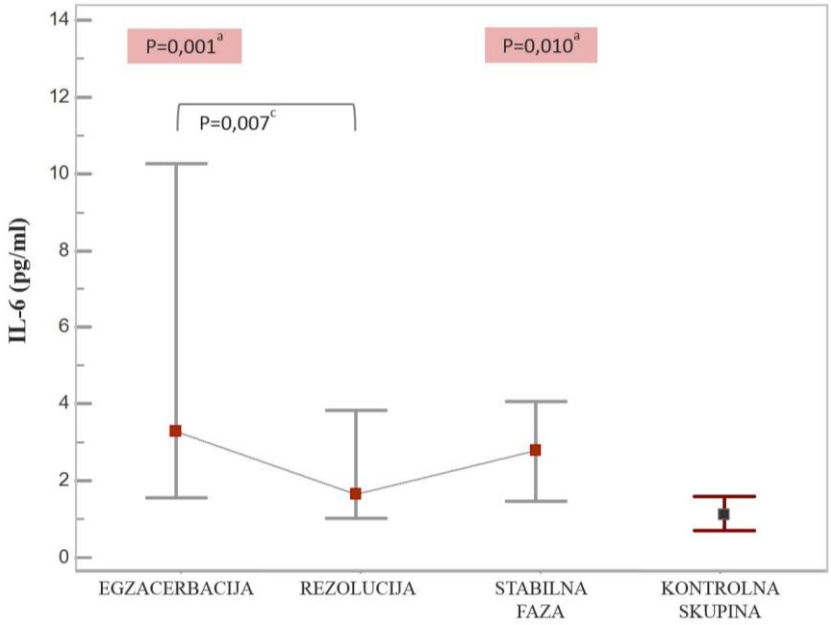


Slika 8. Longitudinalne vrijednosti koncentracije hepcidina u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi KOPB skupine sa skupinom zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Pokazatelji upale

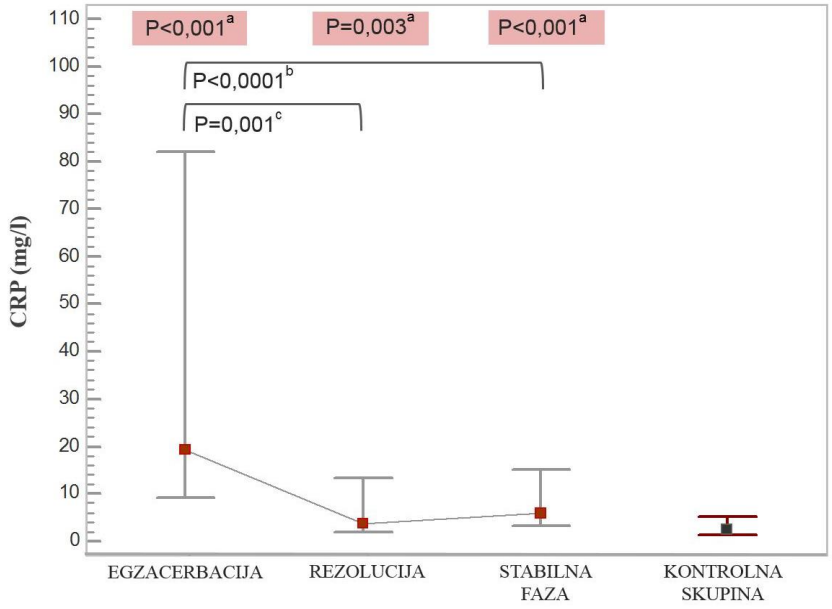
Koncentracija IL-6 bila je statistički značajno viša kod bolesnika s KOPB-om kod prijema i u stabilnoj fazi u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se koncentracija ovog proupalnog citokina nije razlikovala od kontrolne skupine u fazi rezolucije. Vrijednosti IL-6 u fazi egzacerbacije nisu bile statistički značajno više nego u stabilnoj fazi, već samo u odnosu na fazu rezolucije (Slika 9).



Slika 9. Longitudinalne vrijednosti koncentracije IL-6 u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi KOPB skupine sa skupinom zdravih ispitanika.
[c]Razine statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s rezolucijom.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

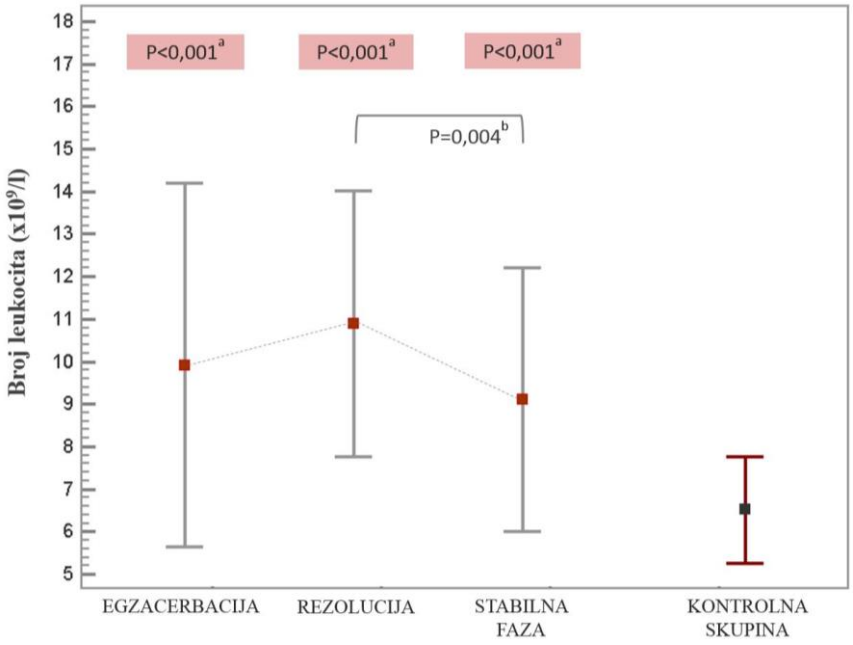
Koncentracija CRP-a u egzacerbaciji bila je značajno viša od vrijednosti ovog reaktanta akutne faze u rezoluciji i u stabilnoj fazi kao i od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini. U sve tri faze mjerenja koncentracija CRP-a bila je značajno viša u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnoj skupini.



Slika 10. Longitudinalne vrijednosti CRP-a u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi KOPB skupine sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razine statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s rezolucijom.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

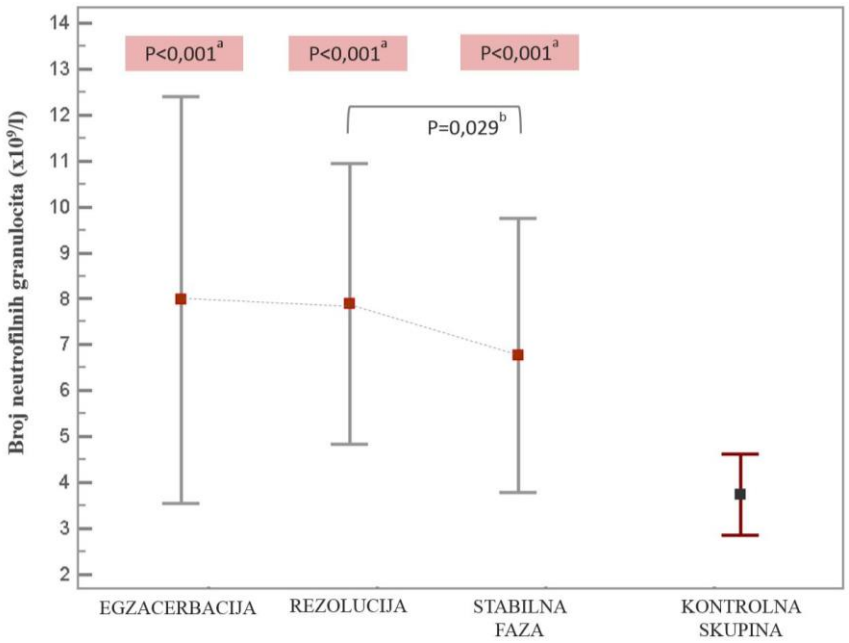
Skupina bolesnika s KOPB-om imala je značajno veći apsolutni broja leukocita (Slika 11) i neutrofilnih granulocita (Slika 12) u sve tri faze u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazujući na stalno prisutnu sistemsku upalu. Oba parametra su u fazi rezolucije, ali ne i u egzacerbaciji, bila statistički značajno viša od vrijednosti dobivenih u stabilnoj fazi.



Slika 10. Longitudinalne vrijednosti broja leukocita u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi KOPB skupine sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razine statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s rezolucijom.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

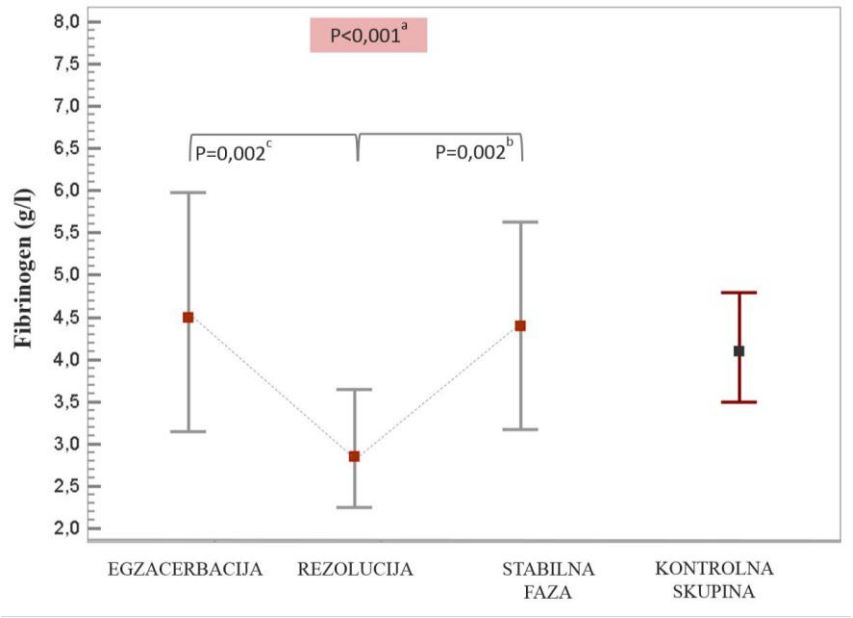
Skupina bolesnika s KOPB-om imala je značajno veći apsolutni broja leukocita (Slika 11) i neutrofilnih granulocita (Slika 12) u sve tri faze u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazujući na stalno prisutnu sistemsku upalu. Oba parametra su u fazi rezolucije, ali ne i u egzacerbaciji, bila statistički značajno viša od vrijednosti dobivenih u stabilnoj fazi.



Slika 12. Longitudinalne vrijednosti apsolutnog broja neutrofila u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

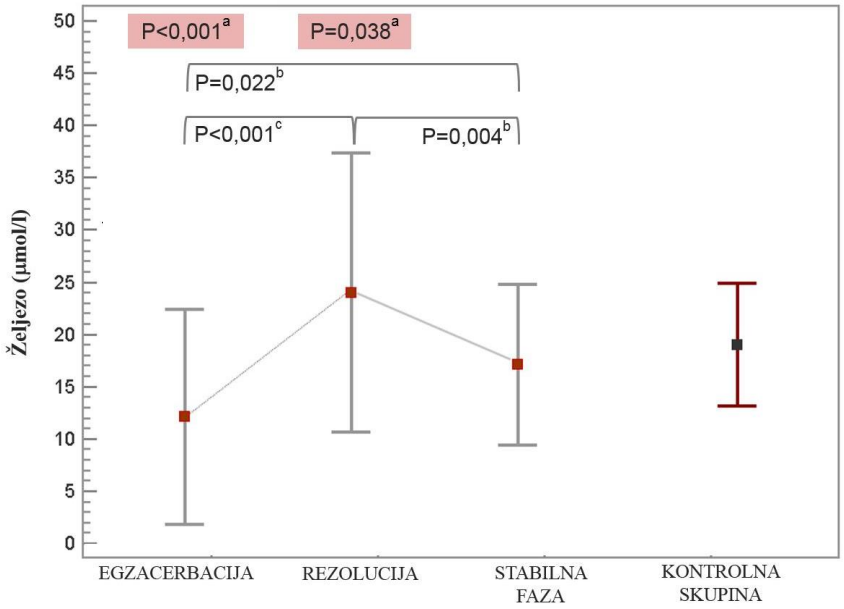
Longitudinalne vrijednosti pokazuju da je koncentracija fibrinogena u fazi rezolucije bila značajno niža od koncentracije fibrinogena u egzacerbaciji, kao i u stabilnoj fazi. Koncentracija fibrinogena nije bila statistički značajno viša u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na kontrolnu skupinu ni u fazi egzacerbacije, ni u stabilnoj fazi bolesti, dok je u fazi rezolucije koncentracija fibrinogena bila niža u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 13).



Slika 13. Longitudinalne vrijednosti koncentracije fibrinogena u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.
[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

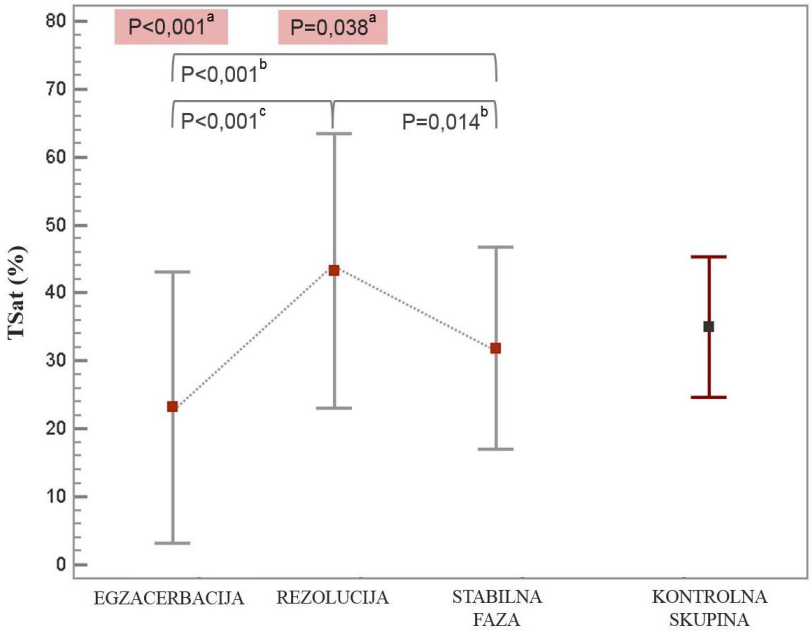
Pokazatelji statusa željeza

Egzacerbaciju KOPB-a, kao što je očekivano, karakterizira značajno snižena koncentracija serumskog željeza i TSat. Razrješenjem akutne krize oba parametra porasla su iznad vrijednosti dobivenih u stabilnoj fazi, kao i onih dobivenih u zdravoj skupini ispitanika. Serumska koncentracija željeza i Tsat-a u stabilnoj fazi bolesti ne razlikuju se od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini (Slike 14 i 15).



Slika 14. Longitudinalne vrijednosti koncentracije željeza u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

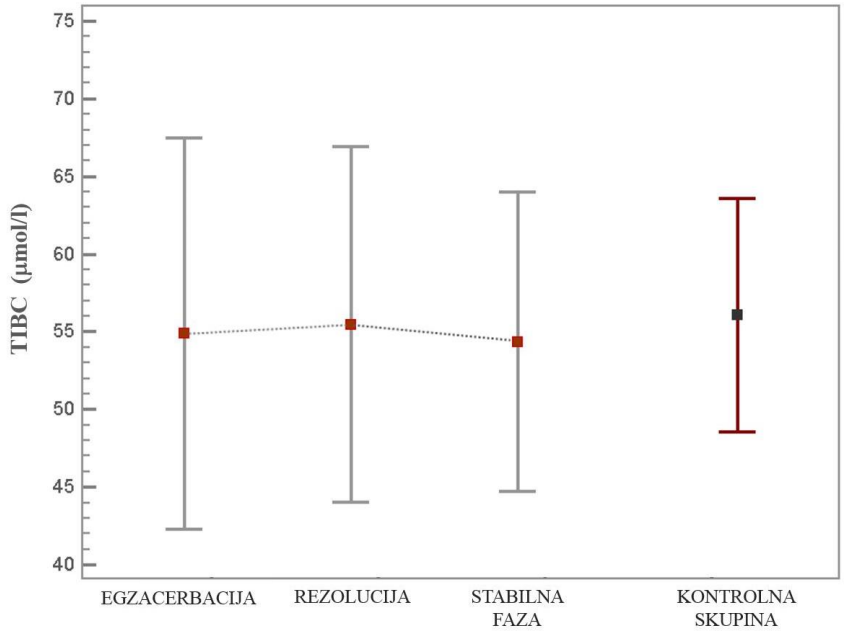
[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 15. Longitudinalne vrijednosti Tsat-a u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

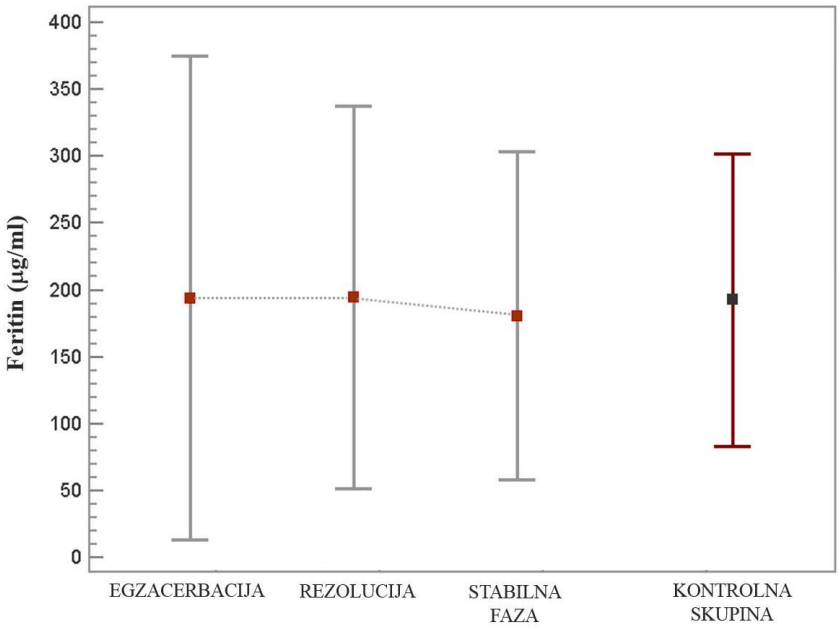
[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Vrijednosti ostalih izmjerenih parametara statusa željeza - TIBC-a i feritina nisu se statistički značajno razlikovale u tri faze mjerenja. Ovi parametri nisu se razlikovali od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini ni u fazi egzacerbacije, ni u stabilnoj fazi (Slike 16 i 17).



Slika 16. Longitudinalne vrijednosti TIBC-a u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

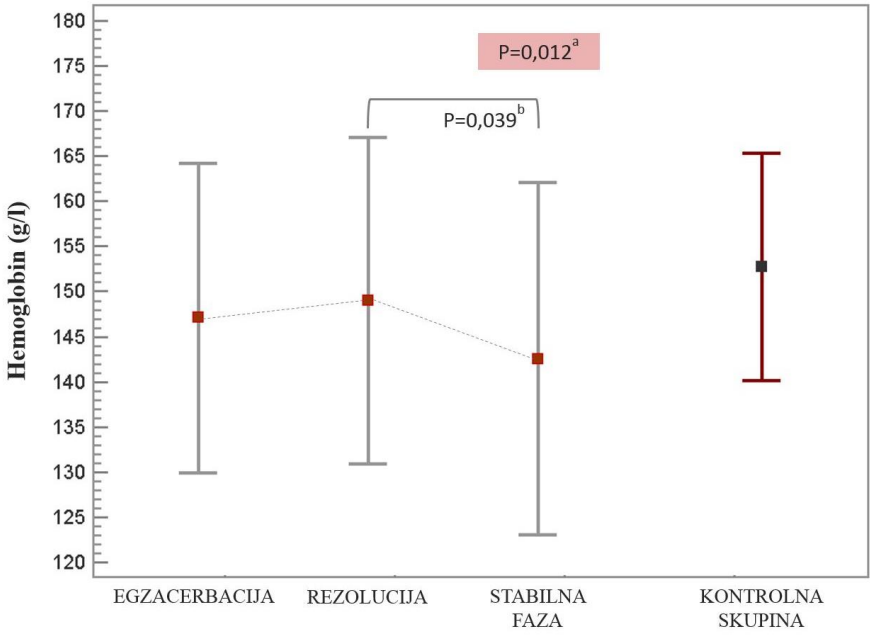


Slika 17. Longitudinalne vrijednosti feritina u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Hemoglobin i pokazatelji eritropoetske aktivnosti

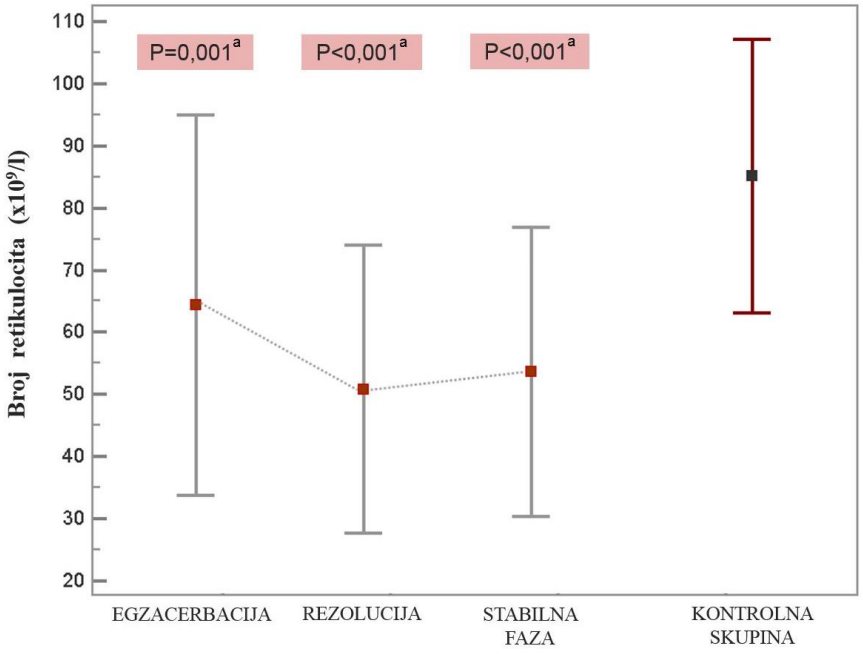
Koncentracija hemoglobina u skupini bolesnika s KOPB-om nije se razlikovala od one zdravih ispitanika u egzacerbaciji i rezoluciji, već je bila značajno niža samo u stabilnoj fazi bolesti, tri mjeseca nakon egzacerbacije KOPB-a. Koncentracija hemoglobina u stabilnoj fazi bila je značajno niža u odnosu na fazu rezolucije, ali ne i fazu egzacerbacije (Slika 18.)



Slika 18. Longitudinalne vrijednosti koncentracije hemoglobina u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

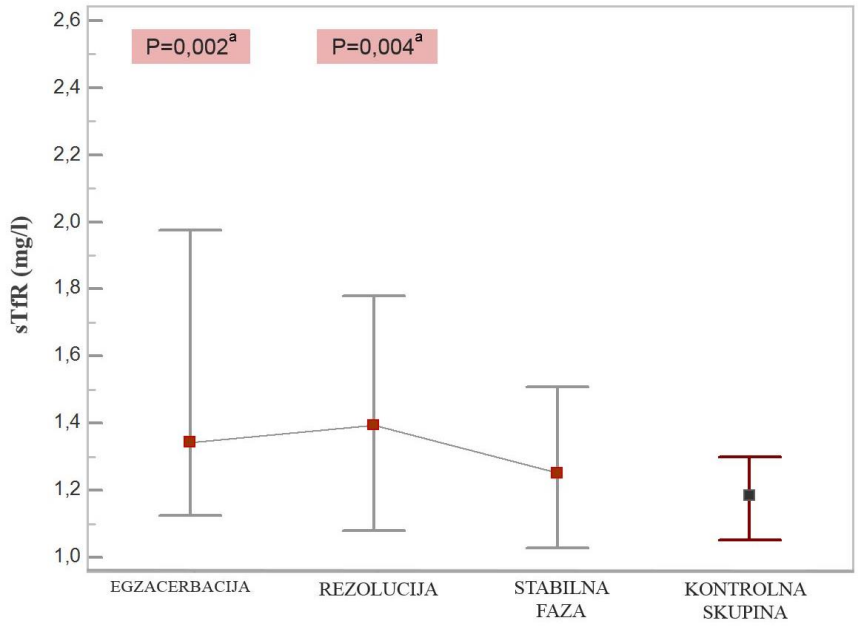
Apsolutni broj retikulocita kao pokazatelj eritropoetske aktivnost u sve tri faze istraživanja bio je niži od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini, ali se vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale u tri mjerenja provedena kod bolesnika s KOPB-om (Slika 19).



Slika 19. Longitudinalne vrijednosti apsolutnog broja retikulocita u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

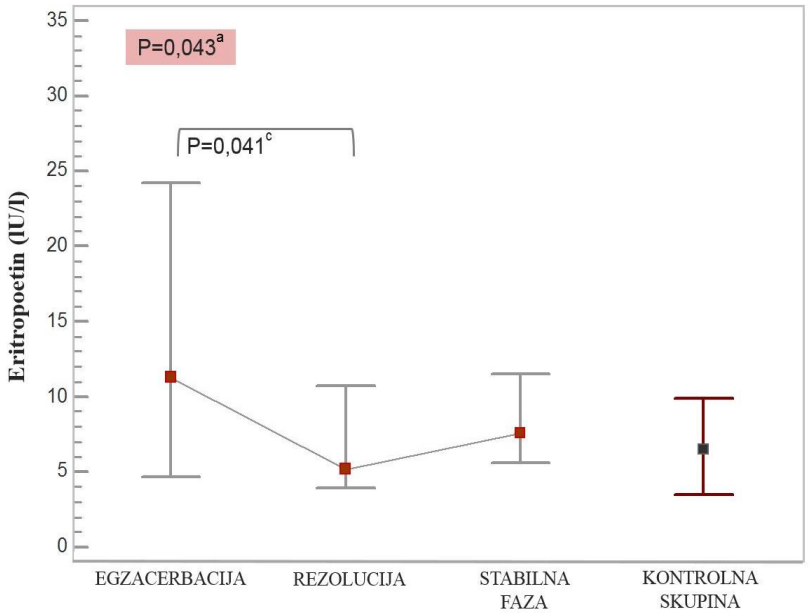
Rezultati pokazuju da je koncentracija sTfR-a kod prijema i u fazi rezolucije značajno viša nego kod zdravih ispitanika (Slika 20).



Slika 20. Longitudinalne vrijednosti koncentracije sTfR u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi KOPB skupine sa skupinom zdravih ispitanika. Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

Koncentracija eritropoetina u skupini pacijenata s KOPB-om bila je samo u fazi egzacerbacije viša u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnoj skupini. U skupini pacijenata s KOPB-om eritropoetin je bio viši u fazi egzacerbacije u odnosu na rezoluciju, ali ne i na stabilnu fazu bolesti (Slika 21).

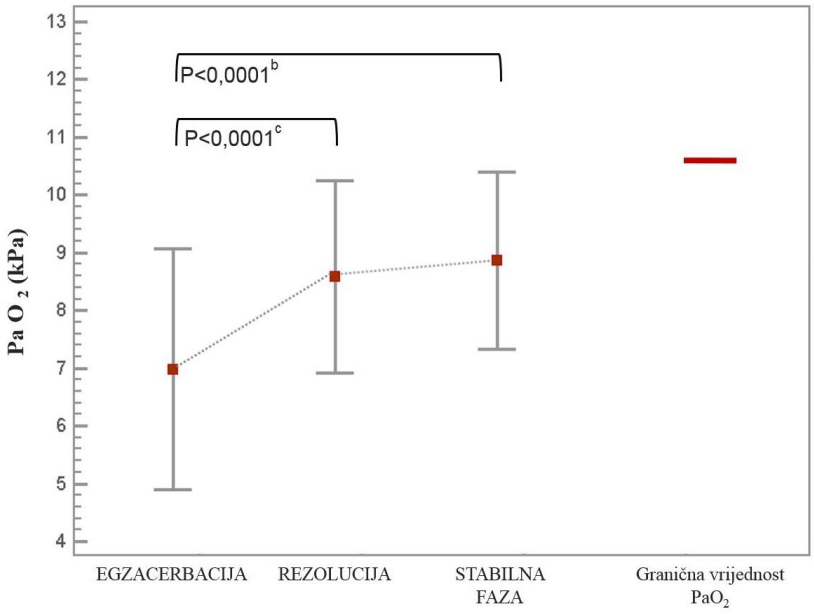


Slika 21. Longitudinalne vrijednosti koncentracije eritropoetina u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

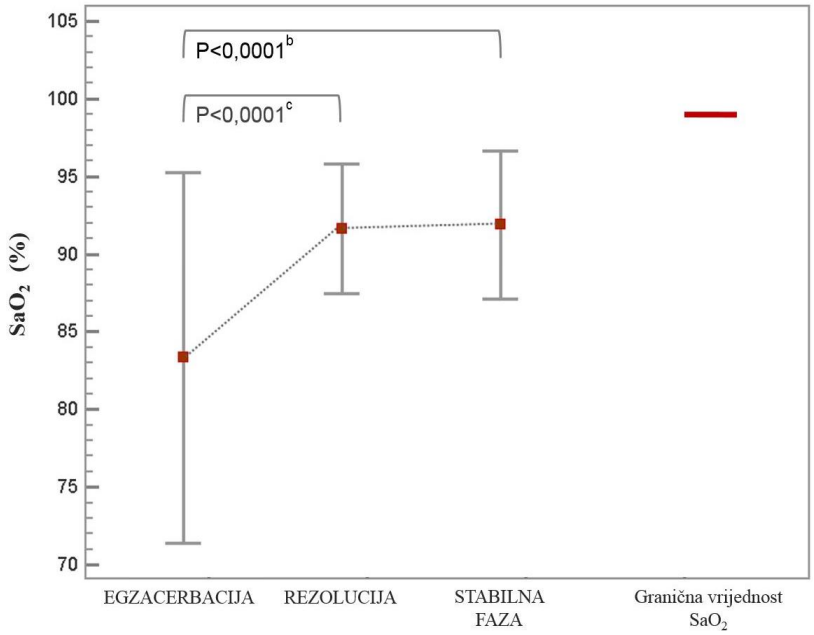
Pokazatelji hipoksije

U egzacerbaciji KOPB-a PaO_2 i SaO_2 bile su značajno niže u odnosu na vrijednosti ovih parametara u fazi rezolucije i stabilnoj fazi KOPB-a (Slike 22 i 23). Budući da ovi parametri nisu izmjereni u skupini zdravih bolesnika na grafovima su crvenom crtom označene granične vrijednosti PaO_2 i SaO_2.



Slika 22. Longitudinalne vrijednosti PaO_2 u skupini bolesnika s KOPB-om.

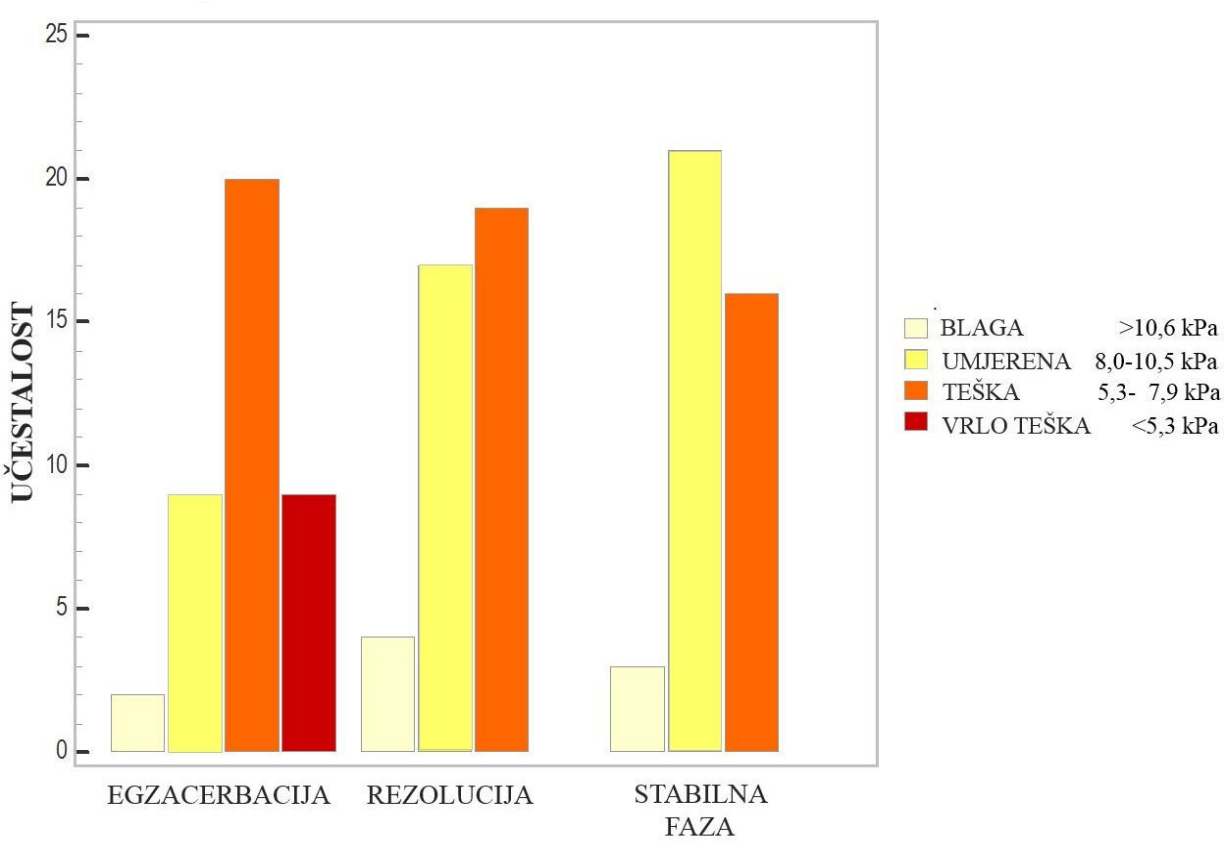
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 23. Longitudinalne vrijednosti SaO_2 u skupini bolesnika s KOPB-om.

[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije sa stabilnom fazom bolesti.
[c]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi egzacerbacije s fazom rezolucije.
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Učestalost bolesnika s različitim stupnjem hipoksemije značajno se razlikovala u tri mjerenja (P=0,001) (Slika 24). U egzacerbaciji je devet bolesnika imalo vrlo tešku hipoksemiju, a dvadeset bolesnika tešku hipoksemiju. U fazi rezolucije vrlo teška hipoksemija nije bila prisutna kod niti jednog bolesnika, dok je teška hipoksemija bila prisutna kod devetnaest bolesnika u fazi rezolucije i šesnaest bolesnika u stabilnoj fazi bolesti.



Slika 24. Distribucija bolesnika prema stupnju hipoksemije u tri faze mjerenja.

Longitudinalne vrijednosti svih izmjerenih parametara kod bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine sažeto su prikazane u tablici 6.

Tablica 6. Longitudinalne vrijednosti hepcidina, hemoglobina, pokazatelja upale, statusa željeza, pokazatelja eritropoetske aktivnosti i hipoksije u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

	KOPB			KONROLNA SKUPINA
Parametar	Egzacerbacija	Rezolucija	Stabilna faza	
Hepcidin (ng/ml)	18,27±17,67[a]	19,23±13,6[a]	15,36±9,51[a]	9,59±4,83
Pokazatelji upale				
IL-6 (pg/ml)	3,74 (1,63-10,32)[a, c]	1,64 (1,03-3,85)	2,79 (1,48-4,07)[a]	1,97 (0,69-1,59)
CRP (mg/l)	19,3 (9,3-82,0)[a, b, c]	3,7 (2,0-13,4)[a]	5,8 (3,2-15,0)[a]	2,5 (1,4-5,2)
Fibrinogen (g/l)	4,5 (3,1-6,0)[c]	2,8 (2,2-3,6)[a, b]	4,4 (3,2-5,6)	4,1 (3,5-4,8)
Leukociti ($\times 10^9$/L)	10,1±4,4[a]	10,7±3,0[a, b]	9,1±3,1[a]	6,1±1,3
Neutrofili ($\times 10^9$/L)	8,1±4,5[a]	7,8±2,9[a, b]	6,6±3,0[a]	3,7±0,9
Hemoglobin i pokazatelji statusa željeza				
Hemoglobin (g/l)	147±17	149±18[b]	142±20 [a]	152±13
Željezo (µmol/L)	12,1±10,2[a, b, c]	24,1±13,4[a, b]	17,2±7,7	19,1±5,9
TIBC (µmol/L)	54,9±12,6	55,43±11,4	54,4±9,6	56,4±7,5
TSat (%)	21±16 [a, b, c]	43±20 [a, b]	32±15	34±11
Feritin (pmol/l)	197±181	195±142	181±122	193±109
Pokazatelji eritropoetske aktivnosti i hipoksije				
Rtc ($\times 10^9$/L)	62,47±31,80[a]	51,44±23,12[a]	53,79±23,39[a]	85,12±21,92
sTfR (mg/L)	1,345 (1,125-1,975)[a]	1,395 (1,08-1,78)[a]	1,250 (1,030-1,510)	1,188 (1,05-1,3)
EPO (IU/l)	11,22 (4,68-24,14)[a]	5,20 (3,95-10,7)	7,28(5,5-11,55)	6,5 (3,5-9,9)
PaO_2 (kPa)	7,05±2,12[b, c]	8,51±1,69	8,88±1,56	n.m.
SaO_2 (%)	82,9±12,6[b, c]	91,4±4,3	91,9±4,8	n.m.

[a]Statistički značajna razlika između skupine bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine ($P<0,05$).
[b]Statistički značajna razlika između faze egzacerbacije ili rezolucije u odnosu na stabilnu fazu bolesti ($P<0,05$).
[c]Statistički značajna razlika između faze egzacerbacije i rezolucije ($P<0,05$).

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ukoliko slijede normalnu raspodjelu u sva tri mjerenja ili kao medijan i 25-ti do 75-ti percentil ako ne slijede normalnu raspodjelu.

EPO (eritropoetin), PaO_2 (parcijalni tlak kisika), Rtc (retikulociti), SaO_2 (saturacija hemoglobina kisikom), sTfR (topivi transferinski receptori), TIBC (ukupni kapacitet vezanja željeza), Tsat (saturacija transferina željezom).

4.2. Povezanost između hepcidina i biokemijskih pokazatelja upale, statusa željeza, eritropoeze i hipoksije u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika s KOPB-om u tri vremenske točke

Povezanost hepcidina s pojedinačnim parametrima sažeto je prikazana u tablici 7.

Tablica 7. Povezanost hepcidina i biokemijskih pokazatelja upale, hemoglobina i statusa željeza i eritropoetske aktivnosti. Vrijednosti otisnute masnim slovima statistički su značajne (P<0,05).

	EGZACREBACIJA	REZOLUCIJA	STABILNA FAZA	KONTROLNA SKUPINA
Korelacija hepcidina s pokazateljima upale				
IL-6	**r= 0,59 (P<0,0001)**	r= 0,19 (P= 0,249)	**r= 0,35 (P= 0,033)**	r= 0,05 (P= 0,807)
CRP	**r= 0,41 (P= 0,010)**	r= -0,003 (P= 0,984)	**r= 0,34 (P= 0,037)**	r= 0,07 (P= 0,721)
LEUKOCITI	r= 0,22 (P= 0,181)	r= -0,09 (P= 0,601)	r= -0,17 (P= 0,316)	r= 0,10 (P= 0,619)
NEUTROFILI	r= 0,20 (P= 0,264)	r= -0,06 (P= 0,758)	r= -0,13 (P= 0,547)	r= -0,01 (P= 0,946)
Korelacija hepcidina s hemoglobinom i pokazateljima statusa željeza				
HEMOGLOBIN	r= 0,14 (P= 0,414)	r= 0,25 (P= 0,118)	r= 0,10 (P= 0,547)	r= 0,15 (P= 0,446)
ŽELJEZO	r= 0,03 (P= 0,822)	r= 0,22 (P= 0,172)	r= -0,04 (P= 0,804)	r= 0,14 (P= 0,471)
TIBC	**r= - 0,59 (P<0,001)**	r= -0,27 (P= 0,100)	**r= - 0,36 (P= 0,028)**	**r= - 0,57 (P= 0,001)**
TSat	r= 0,21 (P=0,206)	**r= 0,41 (P=0,009)**	r= 0,021 (P=0,528)	r=0,24 (P=0,119)
FERITIN	**r= 0,69 (P< 0,001)**	**r= 0,67 (P< 0,001)**	**r= 0,56 (P<0,001)**	**r= 0,58 (P= 0,001)**
Korelacija hepcidina s pokazateljima eritropoetske aktivnosti i hipoksije				
Rtc	**r= -0,46 (P= 0,003)**	r= -0,19 (P= 0,224)	r= -0,05 (P= 0,751)	r= 0,07 (P= 0,719)
sTfR	**r= -0,63 (P< 0,001)**	**r= -0,38 (P= 0,016)**	**r= - 0,34 (P= 0,043)**	r= -0,21 (P= 0,272)
EPO	r= -0,08 (P= 0,65)	r=-0,15 (P= 0,357)	r= -0,08 (P= 0,650)	r= -0,05 (P= 0,776)
PaO_2	r= 0,10 (P= 0,552)	r= -0,18 (P= 0,262)	r= -0,18 (P= 0,290)	/
SaO_2	r= 0,11 (P= 0,493)	r= -0,21 (P= 0,186))	r= -0,09 (P= 0,614)	/

EPO (eritropoetin), PaO_2 (parcijalni tlak kisika), Rtc (retikulociti), SaO_2 (saturacija hemoglobina kisikom), sTfR (topivi transferinski receptori), TIBC (ukupni kapacitet vezanja željeza), Tsat (saturacija transferina željezom).

Vrijednosti otisnute masnim slovima statistički su značajne (P<0,05).

U egzacerbaciji KOPB-a dokazana je dobra povezanost između koncentracije serumskog hepcidina i medijatora upale: IL-6 i CRP-a. Rezultati ukazuju na vrlo dobru pozitivnu povezanost između serumske koncentracije hepcidina i feritina te negativnu povezanost hepcidina i TIBC-a, osobito u fazi egzacerbacije. Ustanovljena je dobra negativna povezanost između serumskog hepcidina i apsolutnog broja retikulocita i sTfR-a.

U fazi rezolucije, serumska koncentracija hepcidina nije korelirala ni s jednim pokazateljem upale, ali je i dalje bila pozitivno povezana s feritinom i umjereno negativno sa sTfR-om. Samo u ovoj fazi istraživanja koncentracija hepcidina je bila pozitivno povezana s Tsat-om.

U stabilnoj fazi dokazana je slaba pozitivna povezanost serumskog hepcidina s IL-6 i CRP-a kao pokazateljima upale. Kao i u fazi rezolucije hepcidin je pozitivno korelirao s feritinom dok je slaba negativna korelacija pokazana za TIBC i sTfR.

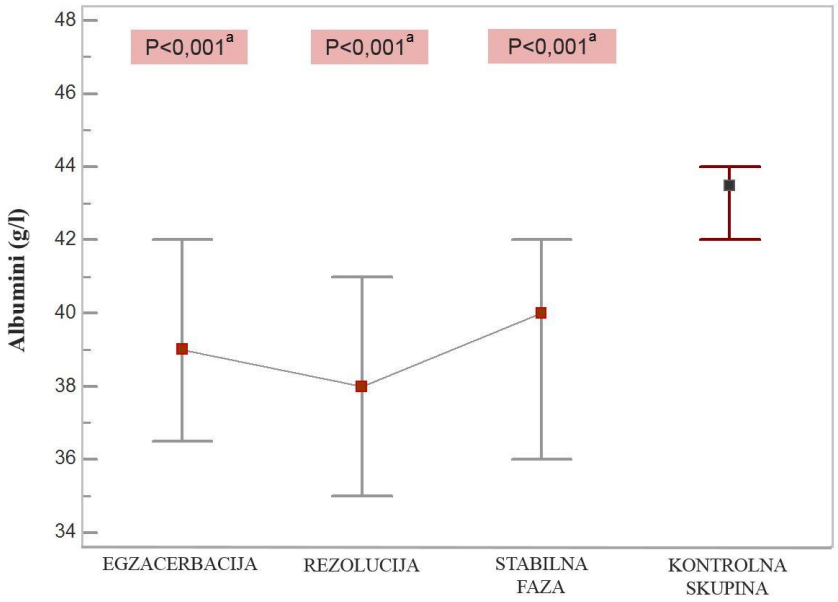
Pokazatelji hipoksije (PaO_2 i SaO_2) nisu korelirali sa serumskim hepcidinom ni u jednoj točki mjerenja. Korelacija hepcidina s ovim parametrima nije nađena ni u *post hock* identificiranoj skupini bolesnika čija je koncentracija hepcidina bila niža u egzacerbaciji nego u stabilnoj fazi bolesti. Ova skupina bolesnika imala je značajno nižu razinu CRP-a i IL-6 te značajno veći broj retikulocita od ostalih bolesnika s KOPB-om, ali mali broj bolesnika (9 bolesnika) u ovoj skupini ne dopušta donošenje zaključka.

Iako epidemiološka istraživanja ukazuju na povezanost između razine medijatora upale – CRP-a i IL-6 i smanjene plućne funkcije tj. FEV_1 takva povezanost nije dokazana u ovoj skupini bolesnika: CRP ($r=0,05$; $P=0,758$), IL-6 ($r=0,05$; $P=0,787$). Nije nađena ni povezanost između hepcidina i FEV_1 ($r=-0,21$; $P=0,251$).

U skupini zdravih ispitanika serumski hepcidin je pokazivao pozitivnu povezanost samo s pokazateljima statusa željeza, pozitivnu s feritinom i negativnu s TIBC-om. Koncentracija hepcidina nije bila povezana ni s jednim pokazateljem upale ili eritropoetske aktivnosti.

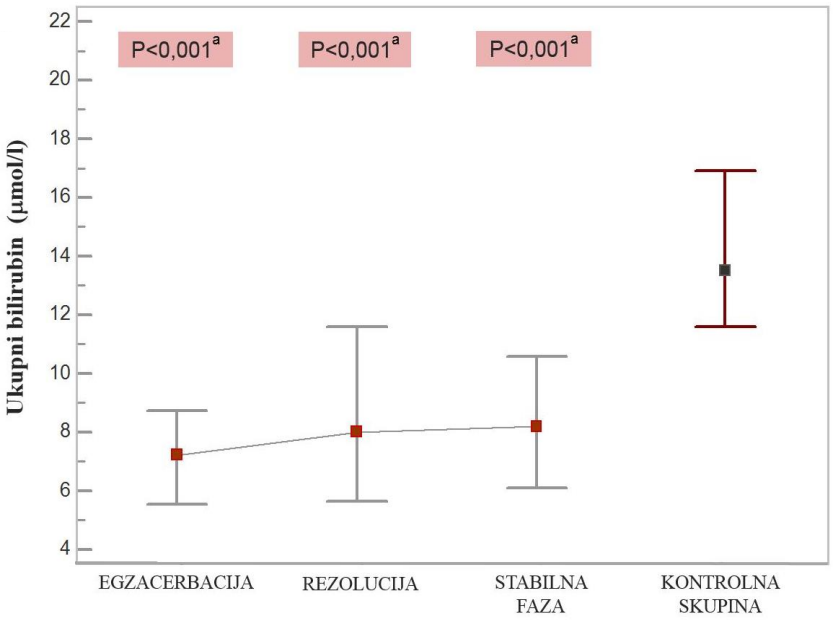
4.3. Longitudinalne vrijednosti pokazatelja oksidacijskog stresa i povezanost hepcidina s pokazateljima oksidacijskog stresa u KOPBu- i kontrolnoj skupini

Koncentracija antioksidacijskih molekula: albumina, ukupnog i direktnog bilirubina u sva tri mjerenja bila je niža od vrijednosti dobivenih za kontrolnu skupinu, ali nije bilo razlike u vrijednostima ovih parametara u tri faze mjerenja (Slike 25-27).



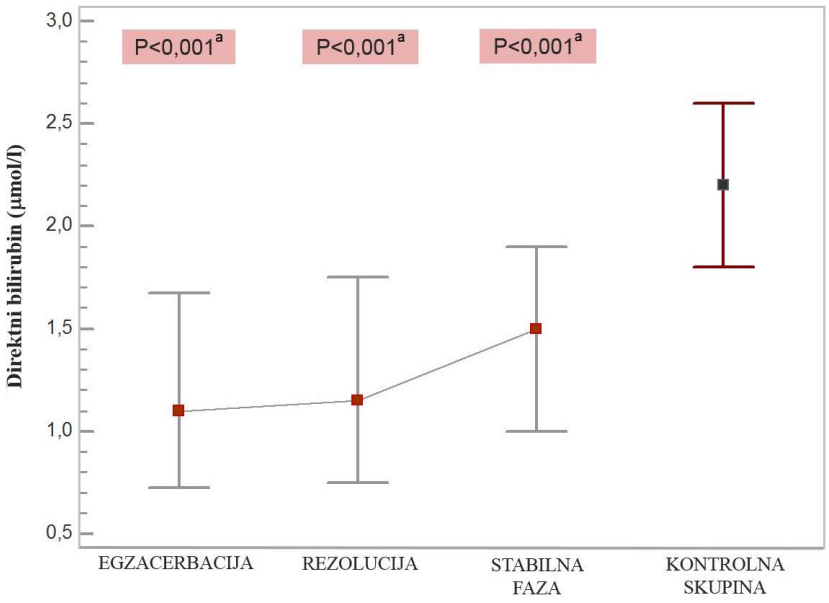
Slika 25. Longitudinalne vrijednosti serumske koncentracije albumina u skupini bolesnika s KOPB-om.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).



Slika 26. Longitudinalne vrijednosti koncentracije ukupnog bilirubina u skupini bolesnika s KOPB-om.

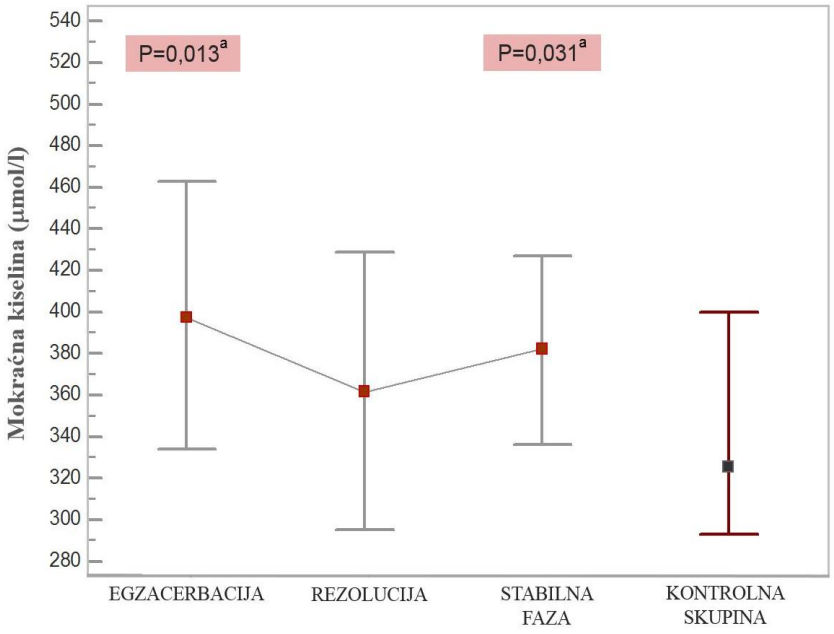
[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).



Slika 27. Longitudinalne vrijednosti koncentracije direktnog bilirubina u skupini bolesnika s KOPB-om.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

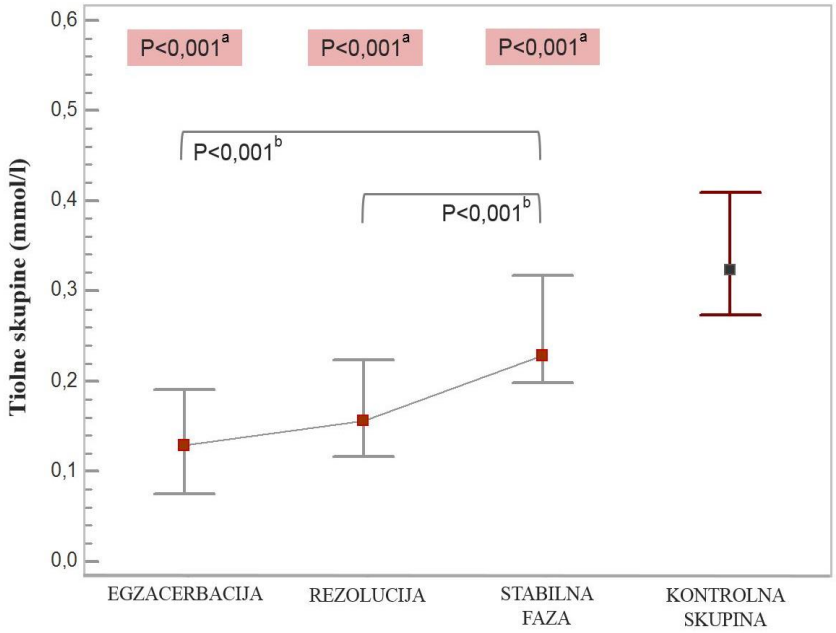
Koncentracija mokraćne kiseline u egzacerbaciji i stabilnoj fazi bila je viša u skupini bolesnika s KOPB-om od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini (Slika 28).



Slika 28. Longitudinalne vrijednosti koncentracije mokraćne kiseline u skupini bolesnika s KOPB-om.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesnika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

Koncentracija tiolnih skupina u sva tri mjerenja kod bolesnika s KOPB-om bila je niža u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je koncentracija u egzacerbaciji i rezoluciji bila značajno niža nego u stabilnoj fazi (Slika 29).



Slika 29. Longitudinalne vrijednosti koncentracije tiola u skupini bolesnika s KOPB-om.

[a]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi skupine bolesmika s KOPB-om sa skupinom zdravih ispitanika.
[b]Razina statističke značajnosti (P) u usporedbi rezolucije ili egzacerbacije sa stabilnom fazom bolesti.
Vrijednosti su prikazane kao medijan (25-ti do 75-ti percentil).

Longitudinalne vrijednosti pokazatelja oksidacijskog stresa sažeto su prikazane u tablici 8.

Tablica 8. Longitudinalne vrijednosti pokazatelja oksidacijskog stresa u skupini bolesnika s KOPB-om i kontrolnoj skupini.

	KOPB			KONTROLNA SKUPINA
Parametar	Egzacerbacija	Rezolucija	Stabilna faza	
Albumini (g/l)	39 (36-42)[a]	38 (35-41)[a]	40 (36-42)[a]	44 (42-44)
Ukupni bilirubin (µmol/l)	7,4 (5,4-9,1)[a]	8,0 (5,9-11,8)[a]	8,3 (6,3-10,6)[a]	12,5 (11,6-19,0)
Direktni bilirubin (µmol/l)	1,2 (0,7-1,7)[a]	1,2 (0,8-1,9)[a]	1,5 (1,0-1,9)[a]	2,2 (1,8-2,6)
Mokraćna kiselina (µmol/l)	400 (328-463)[a]	355 (287-428)	382 (336 -428)[a]	326 (293-400)
Tiolne skupine (mmol/l)	0,127 (0,072-0,179)[a, b]	0,156 (0,117-0,223)[a, b]	0,228 (0,198- 0,317)[a]	0,324±0,107

Vrijednosti otisnute masnim slovima statistički su značajne (P<0,05).

[a]Statistički značajna razlika između KOPB skupine i kontrolne skupine.
[b]Statistički značajna razlika između faze egzacerbacije ili rezolucije u odnosu na stabilnu fazu bolesti.
Podaci su prikazani kao medijan i 25-ti do 75-ti percentile jer ne slijede normalnu raspodjelu.

Serumska koncentracija antioksidacijskih molekula i tiolnih skupina nije bila povezana s koncentracijom hepcidina (Tablica 9).

Tablica 9. Povezanost hepcidina i pokazatelja oksidacijskog stresa.

	EGZACERBACIJA	**REZOLUCIJA**	**STABILNA FAZA**	**KONTROLNA SKUPINA**
Korelacija hepcidina s pokazateljima oksidacijskog stresa				
Ukupni bilirubin	r=0,05 (P= 0,774)	r= 0,026 (P=0,36)	r=0,15 (P=0,389)	r=0,14 (P=0,467)
Direktni bilirubin	r=0,08 (P=0,623)	r= 0,011 (P=0,401)	r=0,05 (P=0,758)	r=0,09 (P=0,649)
Mokraćna kiselina	r= 0,01 (P=0,41)	r=0,13 (P=0,426)	r= -0,10 (P=0,552)	r=0,15 (P=0,43)
Albumini	r=-0,07 (P=0,652)	r=0,15 (P=0,364)	r=0,08 (P=0,657)	r=0,03 (P=0,861)
Tiolne skupine	r= -0,25 (P=0,119)	r=0,02 (P=0,928)	r= -0,16 (P=0,334)	r= -0,12 (P=0,523)

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje je pokazalo da je serumska koncentracija hepcidina povećana u skupini bolesnika s KOPB-om, kako u egzacerbaciji tako i u stabilnoj fazi bolesti. U skupini zdravih ispitanika koncentracija hepcidina je, očekivano, bila povezana samo s pokazateljima statusa željeza – feritinom i TIBC-om, dok je u skupini bolesnika s KOPB-om vrijednost serumskog hepcidina rasla paralelno s pokazateljima upale i bila je povezana s IL-6 koji je glavni poticaj sinteze hepcidina tijekom upale ili infekcije (slike 8 i 9).

Povećana serumska koncentracija hepcidina kod bolesnika s KOPB-om mogla bi biti posljedica inducirane sinteze ovog hormona povećanom koncentracijom IL-6 u cirkulaciji, ali i povećane sinteze hepcidina u plućima. Istraživanja su pokazala da sintezu hepcidina u plućnim makrofagima potiču željezo i lipopolisaharid, a u epitelnim stanicama pluća interferon-γ i IL-6 (197, 198). Smatra se da je ekspresija hepcidina u ovim stanicama važna za održavanje lokalne homeostaze željeza kojoj je cilj obrana od infekcije i željezom posredovanog oksidacijskog stresa. Povećana koncentracija serumskog hepcidina u ovoj skupini bolesnika mogla bi stoga biti i posljedica povećane sinteze u plućima i ″prelijevanja″ hepcidina iz plućnog odjeljka u cirkulaciju. U nizu istraživanja dokazano je da se proteinske molekule mogu kretati iz pluća u sistemsku cirkulaciju (201). Neki dokazi ukazuju da pušenje kao takvo i/ili KOPB mogu povećati permeabilnost plućnih krvnih žila i na taj način doprinijeti prelasku medijatora upale iz plućnog odjeljka u sistemsku cirkulaciju. Stoga se može pretpostaviti da je povećana koncentracija hepcidina u skupini bolesnika s KOPB-om vjerojatno posljedica povećane sinteze ovog peptida u jetri, ali i povećanog stvaranja hepcidina u makrofagima i epitelnim stanicama pluća koju stimulira perzistentna upala u ovom odjeljku.

Povezanost hepcidina s IL-6 bila je snažnija kod prijema ($r=0,59$; $P<0,001$) nego u stabilnoj fazi bolesti ($r=0,35$; $P=0,033$). U fazi rezolucije, serumska koncentracija IL-6 smanjila se na razinu koncentracije ovog citokina u kontrolnoj skupini, a istovremeno se izgubila i povezanost između IL-6 i hepcidina što još jednom ukazuje da je IL-6 vjerojatno glavni regulator sinteze hepcidina kod bolesnika s KOPB-om. Ovakvo kretanje IL-6 vjerojatno je posljedica terapije sistemskim kortikosteroidima tijekom egzacerbacije bolesti, za koje se zna da imaju izrazito imunosupresivno djelovanje.

U nizu istraživanja dokazano je da je IL-6 ključni poticaj za sintezu hepcidina tijekom upale (140-142). Povećana serumska koncentracija hepcidina vezanjem na feroportin smanjuje broj molekula ovog transportera željeza na površini makrofaga RES-a, hepatocita i enterocita, što za posljedicu ima snižavanje serumske koncentracije željeza u cilju ograničavanja dostupnosti ovog elementa patogenima kao dio urođenog imuniteta (141). Gotovo svi patogeni mikroorganizmi trebaju željezo za odvijanje metaboličkih funkcija i razmnožavanje. Strategija uskraćivanja željeza važna je komponenta urođenog imuniteta. Brojna istraživanja su pokazala da su bolesnici koji boluju od nasljedne hemokromatoze skloniji infekcijama što se povezuje upravo s povećanom dostupnošću željeza patogenim mikroorganizmima (202). Vjeruje se da snižavanje serumske koncentracije željeza doprinosi obrani domaćina od infekcije (146). U tom smislu hepcidin predstavlja poveznicu između imuniteta i metabolizma željeza, ali smanjena dostupnost željeza prekursorima eritrocita u koštanoj srži istovremeno za posljedicu ima i snižavanje koncentracije hemoglobina to jest razvoj anemije te se upravo hepcidin smatra glavnim posrednikom AKB-a (138, 139). U fazi egzacerbacije serumska koncentracija željeza i Tsat-a u skupini bolesnika s KOPB-om bile su izrazito niske dok su u fazi razrješenja akutne krize porasle znatno iznad vrijednosti dobivenih u stabilnoj fazi bolesti kao i u kontrolnoj skupini. Porast koncentracije željeza u fazi oporavka mogao bi imati za cilj povećanu opskrbu koštane srži željezom nakon perioda u kojem je zbog upale dostupnost željeza bila smanjena. Serumska koncentracija hepcidina samo je u ovoj fazi pozitivno korelirala s Tsat-om. Povišena TSat potakla je sintezu hepcidina u jetri kako bi se razina željeza smanjila, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja koje su ispitivale regulaciju hepcidina željezom (203, 204).

Izmjerene vrijednosti pokazatelja upale ukazuju na konstantno prisutnu sistemsku upalu koja jača u egzacerbaciji, ali perzistira i u stabilnoj fazi bolesti. Apsolutni broj leukocita i neutrofila bio je konstantno veći u skupini bolesnika s KOPB-om, a značajno više vrijednosti ustanovljene su u fazi rezolucije u odnosu na stabilnu fazu što je vjerojatno posljedica terapije glukokortikoidima. Naime, istraživanja su pokazala da terapija glukokortikoidima uzrokuje porast broja leukocita kojem najviše doprinosi porast broja neutrofilnih granulocita. Uzroci porasta broja leukocita odnosno neutrofilnih granulocita su: otpuštanje leukocita iz marginalnog bazena, odgođena migracija neutrofila u tkiva, odgođena apoptoza te pojačano otpuštanje iz koštane srži (205, 206). Posljedica terapije kortikosteroidima tijekom egzacerbacije vjerojatno je i snižavanje koncentracije fibrinogena u fazi rezolucije na vrijednosti koje su bile niže od vrijednosti dobivenih u skupini zdravih ispitanika, ali i u

usporedbi s vrijednostima u drugim fazama mjerenja. Iako je ovo istraživanje pokazalo da fibrinogen nije značajno povišen u KOPB skupini u odnosu na skupinu zdravih ispitanika, što je u skladu s nekim prethodnim istraživanjima, valja spomenuti da su neka istraživanja ustanovila da je fibrinogen koristan biomarker koji je povezan s rizikom od buduće egzacerbacije bolesti i mortalitetom (207, 208).

Feritin je parametar koji je pokazivao najbolju korelaciju s hepcidinom u svim fazama istraživanja, što je logično budući da hepcidin i feritin na isti način odgovaraju na upalu i promjene statusa željeza. U upali serumska koncentracija feritina i hepcidina rastu jer su oba proteini akutne faze. Kada raspoloživost i rezerve željeza porastu raste koncentracija feritina, ali i hepcidina kako bi se smanjilo nakupljanje željeza. Snažna povezanost između serumskog feritina i hepcidina u svim točkama mjerenja ukazuje da željezo samo ili kinetika njegovog korištenja mogu regulirati ekspresiju hepcidina (151).

Bilo je za očekivati da će jačanje sistemske upale u egzacerbaciji u odnosu na stabilnu fazu uzrokovati veći porast koncentracije hepcidina, ali to nije dokazano. No međutim, dok je koncentracija CRP-a bila značajno viša u egzacerbaciji KOPB-a, koncentracija IL-6 koji je odgovoran za pojačanu ekspresiju hepcidina u upali nije bila viša u ovoj fazi u odnosu na stabilnu fazu čime se može objasniti izostanak očekivanog porasta koncentracije hepcidina u egzacerbaciji. Nadalje, regulacija hepcidina rezultat je integracije više različitih signala, te se ovakav rezultat može objasniti istovremenim utjecajem upale i hipoksije koje su izraženije u egzacerbaciji, ali imaju suprotan učinak na regulaciju hepcidina. Dok porast sinteze hepcidina doprinosi obrani od patogena, potiskivanje sinteze hepcidina hipoksijom omogućava opskrbu prekursora eritrocita dovoljnom količinom željeza u cilju bolje opskrbe tkiva kisikom. Rezultati jedinog do sada objavljenog istraživanja koje je ispitivalo regulaciju hepcidina u KOPB-u pokazali su da je njegova koncentracija niža u skupini s teškim i umjerenim KOPB-om u odnosu na kontrolnu skupinu, te da u skupini bolesnika s teškim KOPB-om ta koncentracija korelira s PaO_2 ($r=0,80$; $P<0,001$) i SaO_2 ($r=0,53$; $P=0,006$)(12). U toj skupini bolesnika koncentracija hepcidina korelirala je sa feritinom, TIBC-om i Tsat-om, ali to nije bio slučaj u skupini bolesnika s blagim i umjerenim oblikom. Serumska koncentracija hepcidina bila je također niža u skupini s teškim -om u odnosu na skupinu s blagim, ali ne i onu s umjerenim KOPB-om. Iako je u ovom istraživanju koncentracija hepcidina korelrala s pokazateljima hipoksije u skupini s teškim KOPB-om, autori nisu prikazali podatke o razini hipoksemije. Nadalje, iz prikazanih rezultata nije jasno postoji li razlika u razini hipoksemije između KOPB skupina. Suprotno njihovim rezultatima, u ovom istraživanju koncentracija

hepcidina bila je povećana u sva tri mjerenja i nije dokazana povezanost s pokazateljima hipoksije. Istraživanja pokazuju da se ekspresija hepcidina smanjuje kao odgovor na hipoksiju, ali mehanizmi regulacije hepcidina hipoksijom još uvijek nisu razjašnjeni. Učinak hipoksije na ekspresiju hepcidina može biti posredovan cirkulirajućim čimbenicima koje otpuštaju stanice kao odgovor na hipoksijom induciranu aktivaciju eritropoeze, ali može biti uzrokovan i izravnim ili neizravnim utjecajem HIF-a na ekspresiju gena za hepcidin (149, 151, 158, 209, 210). Eksperimentalni podaci pokazuju da signalni putovi regulacije hepcidina ne funkcioniraju potpuno neovisno jedan o drugome. U prisutnosti antagonističkih signala serumska koncentracija hepcidina određena je relativnom snagom individualnih regulatora (211). Iako je tijekom egzacerbacije hipoksemija bila značajno jača nego u stabilnoj fazi rezultati ovog istraživanja ne pokazuju korelaciju hepcidina s indikatorima hipoksemije niti u jednoj fazi istraživanja što ukazuje da je u ovoj skupini bolesnika s KOPB-om upalni signal nadvladao negativni signal hipoksije. Međutim, u spomenutom istraživanju Duru i suradnika nije mjerena koncentracija hepcidina, već koncentracija njegovog prohormona koji nije biološki aktivan, a nije mjerena ni koncentracija pokazatelja upale. U radu također nisu prikazani podaci o povezanosti prohepcidina s ostalim izmjerenim parametrima u skupini zdravih ispitanika.

Koncentracija hemoglobina u egzacerbaciji nije se razlikovala od vrijednosti dobivenih u skupini zdravih ispitanika, hemoglobin je imao tendenciju pada i njegova koncentracija je u stabilnoj fazi bolesti bila značajno niža od kontrolne skupine. Drugo longitudinalno istraživanje je dokazale obrnuto kretanje vrijednosti hemoglobina čija je koncentracija bila niža u egzacerbaciji u odnosu na fazu razrješenja i stabilnu fazu te je u toj fazi bila negativno povezana s koncentracijom eritropoetina i IL-6, dok su eritropoetin i IL-6 bili međusobno pozitivno povezani. Autori su zaključili da je uzrok niže koncentracije hemoglobina u egzacerbaciji rezistencija na eritropoetin (194). U našem istraživanju koncentracija EPO bila je značajno viša u egzacerbaciji u odnosu na kontrolnu skupinu. EPO i IL-6 pokazivali su u fazi egzacerbacije slabu povezanost sa graničnom vrijednosti statističke značajnosti ($r=0,31$, $P=0,05$), te se EPO rezistencija ne može u potpunosti isključiti. Rezultati ovog istraživanja ne ukazuju na povezanost hemoglobina i serumske koncentracije hepcidina. U KOPB-u je prisutan niz čimbenika koji utječu na eritropoezu. Nedostatak povezanosti hemoglobina s pojedinačnim parametrima ukazuje na složenost regulacije eritropoeze kod bolesnika s KOPB-om (212).

Skupina bolesnika s KOPB-om imala je u svim fazama praćenja niži apsolutni broj retikulocita što ukazuje na konstantno potiskivanje eritropoeze. Nadalje, broj retikulocita je bio negativno povezan s koncentracijom hepcidina u egzacerbaciji tijekom koje jačaju upalni procesi. Istovremeni negativni utjecaj upalnih citokina i ograničene dostupnosti željeza posredovane hepcidinom kao ograničavajućim čimbenikom u sintezi hemoglobina vjerojatno je rezultirao snižavanjem koncentracije hemoglobina u stabilnoj fazi KOPB-a. Važno je naglasiti da IL-6 može imati negativan utjecaj na eritropoezu neovisno o hepcidinu. Ovaj citokin inhibira sintezu kao i djelovanje eritropoetina na progenitorske stanice eritrocita, narušava funkciju mitohondrija u prekursorima eritrocita što ometa sintezu hemoglobina i sazrijevanje eritrocita.

Iako je sTfR odabran kao pokazatelj eritropoetske aktivnosti, njegova koncentracija u cirkulaciji odražava i gustoću transferinskih receptora na progenitorskim stanicama eritroidne loze koja raste kod nedostatka željeza u nastojanju da se stanice u okolišu siromašnim željezom opskrbe dovoljnom količinom ovog elementa. Serumska koncentracija sTfR-a u skupini bolesnika s KOPB-om bila je viša u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnoj skupini, u egzacerbaciji i u fazi rezolucije. Rezultati su također pokazali negativnu povezanost hepcidina i sTfR-a što je u skladu s nekim prethodnim istraživanjima (118, 215). Obzirom da niži apsolutni broj retikulocita ukazuje na konstantnu supresiju eritropoeze u KOPB skupini, povećana koncentracija sTfR kod prijema mogla bi biti posljedica povećane ekspresije ovog receptora na prekursorskim stanicama eritroidne loze usljed niske dostupnosti željeza, to jest snižene saturacije transferina. Naime, istraživanje Dassler i suradnika je pokazala da upravo Tsat utječe na proteolitičko kidanje transferinskih receptora s površine stanične membrane i da je moguće da ovaj proces ima ulogu u regulaciji metabolizma željeza (55).

Smatra se da je lokalna regulacija sinteze hepcidina u plućima usmjerena na obranu od infekcije, ali i smanjivanje razine oksidacijskog stresa budući da željezo može sudjelovati u Haber-Weiss i Fentonovim reakcijama posredujući u nastajanju ROS-a. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati razinu oksidacijskog stresa, kao i povezanost parametara oksidacijskog stresa i hepcidina. Pokazalo se da je koncentracija oksidacijskog stresa kod bolesnika s KOPB-om veća u odnosu na kontrolnu skupinu što potvrđuje snižena koncentracija antioksidacijskih molekula: ukupnog, direktnog bilirubina i albumina te povišena koncentracija mokraćne kiseline. Serumska koncentracija tiolnih skupina koje su izrazito učinkoviti antioksidansi u skupini bolesnika s KOPB-om bila je također snižena u svim fazama istraživanja u odnosu na kontrolnu skupinu. Razrješavanjem akutne krize

koncentracija tiolnih skupina polako je rasla te je u stabilnoj fazi bila najviša pokazujući da je oksidacijski stres izraženiji u egzacerbaciji, ali perzistira i u stabilnoj fazi. Snižena koncentracija tiolnih skupina kod bolesnika s KOPB-om nađena je i u drugim istraživanjima (216-218).

Albumini predstavljaju glavni antioksidans plazme, tjelesnog odjeljka koji je kontinuirano izložen oksidacijskom stresu zbog velikog kapaciteta vezanja liganda, reaktivnosti s prooksidativnim molekulama, a predstavlja i izvor sulfhidrilnih skupina. U stanjima nakupljanja željeza značajna količina željeza vezana je na albumine čime smanjuje se njegova reaktivnost (219). Niža koncentracija albumina nađena kod bolesnika s KOPB-om mogla bi biti i posljedica prisutne sistemske upale jer je albumin negativni reaktant akutne faze, ali i slabijeg nutricijskog statusa bolesnika iako se BMI skupine bolesnika s KOPB-om nije značajno razlikovao u odnosu na zdrave ispitanike.

Mokraćna kiselina je antioksidans, ali predstavlja i pokazatelj razine oksidacijskog stresa povezanog s visokom aktivnosti ksantin oksidaze (220). Koncentracija mokraćne kiseline bila je u egzacerbaciji i stabilnoj fazi viša od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini što je u skladu s drugim istraživanjima koja su pokazala da je koncentracija mokraćne kiseline povećana u respiracijskim oboljenjima osobito u prisutnosti hipoksije i upale (221). Istraživanja su pokazala da je koncentracija mokraćne kiseline viša kod bolesnika s težim ograničenjem protoka zraka kao i onima koji pripadaju skupini čestih egzacerbatora, te da serumska koncentracija mokraćne kiseline korelira s hipoksemijom kod bolesnika u fazi egzacerbacije, kao i kod bolesnika sa stabilnim KOPB-om (222). Porast serumske koncentracije mokraćne kiseline posljedica je razgradnje purina uslijed tkivne hipoksije. Koncentracija mokraćne kiseline u serumu ispitivana je u nekoliko stanja povezanih s hipoksičnim uvjetima i rezultati konzistentno pokazuju da ovaj parametar odražava teže stanje i lošiju prognozu. Serumska vrijednost mokraćne kiseline bila je povezana s povećanim mortalitetom i rizikom ponavljanja egzacerbacije i hospitalizacijom tijekom praćenja od jedne godine (221).

Bilirubin je razgradni produkt metabolizma hema, ali mu se pripisuju i osobine antioksidansa. Više istraživanja je pokazalo da je pušenje povezano s nižim serumskim koncentracijama bilirubina čija je koncentracija bila niža kod pušača i bivših pušača u odnosu na skupinu nepušača (223, 224). Stoga bi snižena razina bilirubina u skupini s KOPB-om mogla biti povezana s pušenjem budući da je u ovoj skupini bio značajno veći broj pušača

nego u kontrolnoj skupini. Smatra se da bi snižena koncentracija bilirubina mogla biti posljedica povećanog trošenja bilirubina vezanog uz slobodne radikale prisutne u dimu cigareta. Drugi mehanizam koji može utjecati na serumsku koncentraciju bilirubina je aktivnost jetrene bilirubin UDP-glukuroniltransferaze. Poznato je da dim cigareta inducira aktivnost UDP-glukuroniltransferaze koja je inverzno povezana sa serumskom koncentracijom bilirubina (225).

Razumijevanje regulacije hepcidina u KOPB-u važno je zbog nekoliko razloga. Uzrok anemije koja je česta kod bolesnika koji boluju od KOPB-a nije razjašnjen, a nedavno istraživanje je pokazalo da 67,6 % anemičnih bolesnika s kroničnim respiratornim zastojem ima poremećaj metabolizma željeza (226). Nadalje, nedostatak željeza prisutan je kod 40 % bolesnika s KOPB-om koji nisu anemični, a deficit željeza povezan je sa slabim aerobnim kapacitetom (227). Istraživanje Kollerta i suradnika pokazalo je da je koncentracija hemoglobina povezana s dugoročnim preživljavanjem bolesnika s KOPB-om i da su vrijednosti hemoglobina značajno više od graničnih vrijednosti za anemiju povezane s boljim preživljavanjem (192). Nadalje, plućna arterijska hipertenzija (PAH) česta je komplikacija KOPB-a, a istraživanja pokazuju da dostupnost željeza utječe na vaskularni odgovor na hipoksiju. Istraživanje Rhodesa i suradnika je pokazalo da je deficit željeza čest u idiopatskoj PAH i da bi mogao biti posljedica upravo povišene razine hepcidina (215).

Ovo istraživanje je sveobuhvatno budući da je ispitivan istovremeni utjecaj različitih signala na regulaciju hepcidina: statusa željeza, upale, hipoksije, eritropoetske aktivnosti. Svi parametri mjereni su u fazi egzacerbacije, nakon razrješenja akutne krize i u stabilnoj fazi bolesti nakon tri mjeseca. Istraživanje je uključila i skupinu zdravih ispitanika podudarnih po dobi i spolu sa skupinom bolesnika s KOPB-om što je važno budući da su parametri statusa željeza kao i koncentracija hepcidina ovisni o dobi, a metode za određivanje hepcidina nisu standardizirane (228). Postoji nekoliko ograničenja ovog istraživanja. Iako su u istraživanje uključeni samo bolesnici s normocitnom, normokromnom anemijom nije mjerena koncentracija vitamina B_{12} ni folne kiseline te nije ispitivano okultno krvarenje kao mogući uzrok anemije. No međutim, isključena je većina stanja koja bi mogla utjecati na koncentraciju hemoglobina ili je poznato da utječe na koncentraciju hepcidina. U istraživanje je uključeno devet bolesnika s KOPB-om koji su bili na kontinuiranoj terapiji kisikom. Neki bolesnici su u egzacerbaciji liječeni suportivnom terapijom kisikom što ometa procjenu utjecaja hipoksije na hepcidin. Ovim bolesnicima je uzorak arterijske krvi za plinske analize kod prijema u bolnicu kao i na kontrolnom pregledu uzeta bez kisika, te izmjereni parametri

PaO_2 i SaO_2 nisu stoga bili odraz stupnja oksigenacije tkiva koji je utjecao na regulaciju hepcidina.

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovoga rada je ispitati povezanost između: promjena u koncentraciji serumskog hepcidina i čimbenika koji ga reguliraju kod bolesnika s AEKOPB-om u tri vremenske točke, da bi se ispitalo kako ovi čimbenici utječu na koncentraciju hepcidina i osiguravanje dovoljne opskrbe željezom neophodnim za eritropoezu.

- Serumska koncentracija hepcidina povećana je u egzacerbaciji i stabilnom KOPB-u. U skupini bolesnika s KOPB-om vrijednost serumskog hepcidina raste paralelno s pokazateljima upale i povezana je s IL-6 koji je glavni regulator sinteze hepcidina tijekom upale ili infekcije. U skupini zdravih ispitanika, u odsutnosti upale, koncentracija hepcidina povezana je samo s feritinom i TIBC-om kao pokazateljima statusa željeza.
- U svim fazama istraživanja hepcidin je pokazivao najbolju povezanost s feritinom što je očekivano budući da hepcidin i feritin na isti način odgovaraju na upalu i promjene statusa željeza.
- Iako je tijekom egzacerbacije hipoksemija bila značajno jača nego u stabilnoj fazi, rezultati ovog istraživanja ne pokazuju povezanost hepcidina s indikatorima hipoksemije ni u jednoj fazi istraživanja što ukazuje da je u ovoj skupini bolesnika s KOPB-om pozitivni upalni signal nadvladao negativni signal hipoksije.
- Skupina bolesnika s KOPB-om imala je u svim fazama praćenja niži apsolutni broj retikulocita što ukazuje na konstantno potiskivanje eritropoeze. Broj retikulocita bio je negativno povezan s koncentracijom hepcidina u egzacerbaciji tijekom koje jačaju upalni procesi.
- Rezultati istraživanja pružaju uvid u dinamičku regulaciju hepcidina i promjene pokazatelja statusa željeza pod utjecajem upale i hipoksije u egzacerbaciji i stabilnoj fazi bolesti. Za razliku od ostalih parametara koji su pokazatelji statusa željeza, promjene u koncentraciji hepcidina uzrok su poremećaja metabolizma željeza. Stoga mjerenje ovog parametra može pomoći u razjašnjavanju uzroka apsolutnog ili relativnog nedostatka željeza kao i uzroka razvoja anemije kod bolesnika s KOPB-om što bi moglo ukazati na odgovarajući tretman.

7. LITERATURA

1. Andrews NC. Metal transporters and disease. Curr Opin Chem Biol 2002;6:181-6.

2. Latunde-Dada GO, Simpson JR, McKie AT. Recent advances in mammalian haem transport. Trends Biochem Sci 2006; 31:182-8.

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

4. Andrews NC. Medical Progress: Disorders of Iron Metabolism. N Engl J Med 1999;341:1986-95.

5. WHO. Programme and project: WHO. Available at: http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html Accessed August 10th 2011.

6. Liu K, Kaffes AJ. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and managment. Eur J Gastroenterol Hepatol 2012; 24:109-16.

7. Yen AW, Fancher TL, Bowlus CL. Revisiting hereditary hemochromatosis: Current Concepts. Am J Med 2006;119:391-9.

8. Stankowski JN, Dawson VL, Dawson TM. Ironing out tau's role in Parkinsonism. Nat Med 2012;18:291-5.

9. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. Nat Med 2012;18:291-5.

10. Huang X, O`Brien PJ, Templeton DM. Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity I. Iron toxicity. Chem Biol Interact 2006;163:68-76.

11. Guidi GC, Santonastaso CL. Advancements in anemias related to chronic conditions. Clin Chem Lab Med 2010; 48:1217-26.

12. Umbreit J. Iron deficiency: A Concise Review. Am J Hematol 2005;78:225-31.

13. Watt RK, Hilton RJ, Graff DM. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions traverse the ferritin protein shell. Biochim Biophys Acta, 2010;1800:745-59.

14. Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. Mol Aspect Med 2005;26:299-312.

15. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. Mol Cell 2000;5:299-309.

16. McKie AT, Barlow DJ. The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1). Pflugers Arch 2004;447:801-6.

17. Latunde-Dada GO, Takeuchi K, Simpson RJ, McKie AT. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. FEBS Lett 2006; 580:6865-870.

18. Conrad ME, Umbreit EG, Moore LN, Porubcin M, Hainsworth MJ, Simovich MT i sur. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000; 279:767-74.

19. Umbreit JN, Conrad, ME, Hainsworth LN, Simovich M. The ferrireductase paraferritin contains divalent metal transporter as well as mobilferrin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:534-39.

20. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sanger G, Mudaly E i sur. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science 2001;291:1755-59.

21. Aisen P. Transferrin receptor 1. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:2137-43.

22. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:10812-17.

23. White KN, Conesa C, Sánchez L, Amini M, Farnaud S, Lorvoralak C i sur. The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. Biochim Biophys Acta 2012;1820:411-6.

24. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N i sur. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the SLA mouse. Nat Genet 1999;21:195-9.

25. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:10919-24.

26. Munoz M, Garcia-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. J Clin Pathol 2011;64:281-6.

27. De Domenico I, Vaughn MB, Paradkar PN, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Decoupling ferritin synthesis from free cytosolic iron results in ferritin secretion. Cell Metab 2011;13:57–67.

28. Canonne-Hergaux F, Gruenhied S, Ponka P, Gross P. Cellular and subcellular localisation of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. Blood 1999;93:4406-17.

29. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eucariotic iron metabolism. Int J Biochem Cell Biol 2001;33:940-59.

30. Garric MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC, Zhao L, Knopfrl M. DMT1: Which metals does it transport? Biol Res 2006;39:79-85.

31. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. Blood Cells Mol Dis 2002;29:336-55.

32. Ranganathan PN, Lu Y, Fuqua BK, Collins JF. Immunoreactive hephaestin and ferroxidase activity are present in the cytosolic fraction of rat enterocytes. Biometals 2012;25:687-95.

33. Simovich MJ, Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Smith HK. Cellular localisation of proteins related to iron absorption and transport. Am J Hematol 2002;69:164-70.

34. Hou S, Reynolds MF, Horrigan FT, Heinemann SH, Hoshi T. Reversible binding of heme to proteins in cellular signal transduction. Acc Chem Ress 2006;39:918-24.

35. Shayeghi, M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N. Identification of an intestinal heme transporter. Cell 2005;122:789–801.

36. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E i sur. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell 2006;127:917-28.

37. Ma Y, Yeh M, Yeh K, Glass J. Iron Imports V: Transport of iron through the intestinal epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:417-22.

38. Philpott CC. Coming into view: eukaryotic iron chaperones and intracellular iron delivery. J Biol Chem 2012;287:13518-23.

39. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. Science 2008;320:1207–10.

40. Mühlenhoff U, Molik S , Godoy JR , Užarska MA , Richter N , Seubert A i sur. Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster. Cell Metab 2010;12:373-85.

41. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. J Biol Chem 2000;275:19906–19912.

42. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J i sur. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature 2000;403:776-81.

43. Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A i sur. Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. Blood 2005;105:4861–4864.

44. Ward DM, Kaplan J.Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. Biochim Biophys Acta 2012;1823:1426-33.

45. Delaby C, Pilard N, Puy H, Canonne-Hergaux F. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. Biochem J 2008;411:123-31.

46. Harada N, Kanayama M, Maruyama A, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T i sur. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. Arch Biochem Biophys 2011;508:101-9.

47. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. Cell Metab 2009;9:461-73.

48. Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Hepcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. Blood 2011;118:2868-77.

49. di Patti MC, Maio N, Rizzo G, De Francesco G, Persichini T, Colasanti M i sur. Dominant mutants of ceruloplasmin impair the copper loading machinery in aceruloplasminemia. J Biol Chem 2009;284:4545-54.

50. De Domenico I, Lo E, Yang B, Korolnek T, Hamza I, Ward DM i sur. The role of ubiquitination in hepcidin-independent and hepcidin-dependent degradation of ferroportin. Cell Metab 2011;14:635-46.

.51. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. Biochim Byophys Acta 2012;1820:188-202.

52. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3579-83.

53. Duk-Hee L, David R, Jacobs JR. Serum markers of stored body iron are not appropriate markers of health effect of iron: a focus on serum ferritin. Med Hypotheses 2004;62:442-5.

54. Brissot P, Ropert M, Lan CL, Loreal O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. Biochim Biophys Acta 2012;1820:403-10.

55. Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. J Biol Chem 2006;6:3297-304.

56. Gao J, Kramer J, Chen M, Tsukamoto H, Enns AS, Zhang CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. Cell metab 2009;9:217-227.

57. Rapisarda C, Puppi J, Hughes RD, Dhawan A, Fernaud S, Evans RW i sur. Transferrin receptor 2 is crucial for iron sensing in human hepatocytes. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299:G778-83.

58. Goswami T, Andrews CN. Hereditary hemochromatosis protein, HFE: interaction with transferin receptor 1 suggests a molecular mechanism of iron sensing. J Biol Chem 2006;281:28494-8.

59. Worthen CA, Enns CA.The role of hepatic transferrin receptor 2 in the regulation of iron homeostasis in the body. Front Pharmacol 2014 Mar 6;5:34. doi: 10.3389/fphar.2014.00034. eCollection 2014.

60. Wallace D, Summervile L, Subramaniam VN. Targeted disruption of hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. Gastroenterology 2007;132:301-10.

61. Forejtnikovà H, Vieillevoye M, Zermati Y, Lambert M, Pellegrino RM, Guihard S i sur. Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. Blood 2010;116:5357–5367.

62. Pagani A, Vieillevoye M, Nai A, Rausa M, Ladli M , Lacombe C i sur. Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. Haematologica 2015;100:458–465.

63. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. Biochem Cell Biol 1999;31:1111-37.

64. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, McDonald B, Chen A, Antiochos J i sur. Identification of ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erithroyd cells. Nat Genet 2005;37:1264-9.

65. Elliott RL, Head JF. Cancer: Tumor Iron Metabolism, Mitochondrial Dysfunction and Tumor Immunosuppressio ; “A Tight Partnership—Was Warburg Correct?” JCT 2012;3:278-311.

66. Hider RC, Kong XL. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. Biometals 2011;24:1179-87.

67. Andrews NC. Probing the iron pool. Focus on "Detection of intracellular iron by its regulatory effect". Am J Physiol Cell Physiol 2004;287:C1537-8.

68. Schneider BD, Leibold EA. Regulation of mammalian iron homeostasis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2000;3:267-73.

69. Raje CI, Kumar S, Harle A, Nanda JS, Raje M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. J Biol Chem 2007;282:3252-61.

70. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. Free Radic Biol Med 2011;50:1647–58.

71. Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage. J Struct Biol 1999;126:182-94.

72. Watt RK, Hilton RJ, Graff DM. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. Biochim Biophys Acta, 2010. Biochim Biophys Acta 2010;1800:745-59.

73. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Specific iron chelators determine route of ferritin degradation. Blood 2009;114:4546-51.

74. Asano T, Komatsu M, Iwai YY, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. Mol Cell Biol 2011;31:2040-52.

75. Surguladze N, Thompson KM, Beard JL, Connor JR, Fried MG. Interaction and reactions of ferritin with DNA. J Biol Chem 2004;279:14694-702.

76. Alkhateeb A, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. Biochim Biophys Acta 2010;1800:793-7.

77. Bou-Abdallah F, Santambrogio P, Levi S, Arosio P, Chasteen ND. Unique iron binding and oxidation properties of human ferritin: A comparative analysis with human H-chain ferritin. J Mol Biol 2005;347:543-54.

78. Choen, LA. Serum ferritin is derivied primarly from macrophages through a nonclassical secretory pathway. Blood 2010;116:1574-84.

79. Wang W. Serum ferritin: Past, present and future. Biochim Biophys Acta 2010;1800:760-9.

80. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P i sur. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. Cell Metab 2005;2:399-409.

81. Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, X Liu i sur. Ferritin ″A novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs Am J Physiol Cell Physiol 2007;293:C641-9.

82. Cavill I. Iron and erythropoietin in renal disease. Nephrol Dial Transplant 2002;17:19-23.

83. Finch C. Regulators of iron balance in humans. Blood 1994;6:1697-702.

84. Ozaki M, Awai T, Kawabata M. Iron release from haemosiderin and production of iron-catalysed hidroxyl radicals *in vitro*. Biochem J 1988;250:589-95.

85. Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. Front Pharmacol 2014:13;5:124. doi: 10.3389/fphar.2014.00124. eCollection 2014.

86. Clarke SL, Vasanthakumar A, Anderson SA, Pondarre C, Koh CM, Deck KM i sur. Iron-responsive degradation of regulatory protein 1 does not require the Fe-S cluster. EMBO J 2006;25:544-53.

87. Meyron-Holtz EG, Gosh MC, LaVaute I, Brazzolotto T, Kazuhiro X, Berger UV i sur. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. EMBO J 2004;23:386-95.

88. Sanchez M, Galy B, Schwanhaeusser B, Blake J, Bähr-Ivacevic T, Benes V i sur. Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. Blood 2011;118:168-79.

89. Eisenstein RS, Biemings KP. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. J Nutr 1998;128:2295-98.

90. Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonnaux C. The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. Blood 201;122:885-92.

91. Park CH i sur: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 2001;276:7806-10.

92. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P i sur. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 2000;480:147-50.

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

94. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B i sur. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:4596-601.

95. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. Blood 2002;100:3776-81.

96. Kulaksiz H, Gherke DG, Rost A, Janetzko D, Kallinowski T, Bruckner B i sur. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renall insufficiency, and renal anemia. Gut 2004;53:735-43.

97. Valore E, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormon convertase furin. Blood Cells Mol Dis 2008;40:132-38.

98. Gagliardo B, Kubat N, Faye A, Jaouen M, Durel B, Deschemin JC i sur. Pro-hepcidin is unable to degrade iron exporter ferroportin unless maturated by furin-dependent process. J Hepatol 2009;50:394-401.

99. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW i sur. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. Blood 2009;113:6225-36.

100. Itkonen O, Stenman UH, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hämäläinen E. Binding of hepcidin to plasma proteins. Clin Chem 2012;58:1158-60.

101. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. Blood 2008;112:4292–97.

102. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. J Biol Chem 2002;277:37597-603.

103. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Ar edson T, Syed R, Li V i sur. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. J Biol Chem 2009;284:24155-67.

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

105. Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA i sur. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. J Clin Invest 2011;121:4880-8.

106. Maisetta G, Petruzzelli R, Brancatisano FL, Esin S, Vitali A, Campa M i sur. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains:Effect of copper and acidic pH. Peptides 2010;31:1995–2002.

107. Barthe C, Hocquellet A, Garbay B. Bacteriostatic activity of the proregion of human hepcidin. Protein Pept Lett 2011;18:36-40.

108. De Domenico I, McVey WD, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Wesley i sur. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. Mol Biol Cell 2007;18:2569-78.

109. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science 2004;306:2090-93**.**

110. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. Biochim Biophys Acta 2012;1823:1426-33.

111. De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS i sur. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. Cell Metab 2008;8:146-56.

112. Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T i sur. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. Blood 2009;114:437-4.

113. De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:3800-5.

114. Sangwaiya A, Manglam V, Busbridge M, Thursz M, Arnold J. Blunted increase in serum hepcidin as response to oral iron in HFE-hemochromatosis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2011;23:721-4.

115. Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD, Smith A. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism. Biometals 2006;18:339-48.

116. Chung AYF, Leo KW, Wong GC, Chuah KL, Ren JW, Lee CGL. Giant hepatocelullar adenoma presenting with chronic iron deficiency anemia. Am J Gastroenterol 2006;101:2160-2.

117. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009:207-14.

118. Kemna EH, Kartikasari AE, van Tits LJ, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples. Blood Cells Mol Dis 2008;40:339-46.

119. Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F i sur. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. Blood 2008;111:5727–33.

120. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT i sur. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. Nat Med 2007; 13:1096–101.

121. Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essentioal for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. J Clin Invest 2005;115:2180-6.

122. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dube MP i sur. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. Nat Genet 2004;36:77-82.

123. Bartnikas TB, Fleming MD. Hemojuvelin is essential for transferrin-dependent and transferrin-independent hepcidin expression in mice. Haematologica 2012; 97:189-92.

124. Drake SF, Morgan EH, Herbison CE, Delima R, Graham RM, Chua AC i sur. Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;292:G323-8.

125. Chen J, Enns C. Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. Biochim Biophys Acta 2012;1820:256-63.

126. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y i sur. The serine protease TMPRSS6 Is required to sense iron deficiency. Science 2008;320:1088-92.

127. Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintanance of systemic iron homeostasis. Blood 2010;115:3817-3826.

128. Tanno T, Porayette A, Orapan S, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A i sur. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. Blood 2009;114:181–6.

129. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK i sur. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. J Clin Invest 2004;113:1271-6.

130. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. Nat Genet 2014;46:678-84.

131. Meynard D, Babitt JL, Lin HY. The liver: conductor of systemic iron balance. Blood 2014;123:168-76.

132. Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. Clin Chem 2011;57:1650-69

133. Babitt JL, Huang WH, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA i sur. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat Genet 2006;38:531-39.

134. Merle U, Theiling F, Fein E, Gherke S, Riedel B, Kallinowski HD i sur. Localization of the iron-regulatory proteins hemojuvelin and transferrin receptor 2 to the basolateral domain of hepatochytes. Histochem Cell Biol 2007;127:221-6.

135. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. J Clin Invest 2007;117:1933-9.

136. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. Biochim Biophys Acta 2012;1823:1434-43.

137. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH i sur. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. Blood 2008;112:1503-9.

138. Theur I, Schroll A, Nairz M, Selfert M, Theurl M, Sonnweber T i sur. Pathways for the iron regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia *in vivo*. Haematologica 2011;96:1761-69.

139. Vyoral D, Petrak J. Hepcidin: A direct link between iron metabolism and immunity Int J Biochem Cell Biol 2005;37:1768-73.

140. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6 and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE, transferrin receptor 2 and beta-2-microglobulin-deficient hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:9263-5.

141. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichenstein A, Ganz T. Hepcidin, putative mediator of anemia of inflammation, is type II acute-phase protein. Blood 2003;101:2461-3.

142. Kemna EP, Nemeth E, van der Hoeven H, Pickkers, Swinkels D. Time course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. Blood 2005;106:1864-6.

143. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. Int Immunol 2010;22:347-52.

144. Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM i sur. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. PLoS One 2014;9:e96053.

145. Wrighting D, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. Blood 2006;108:3204-9.

146. Ong ST, Ho JZ, Ho B, Ding JL. Iron-withholding strategy in innate immunity. Immunobiology 2006;211:295-314.

147. Cherayil BJ. The role of iron in the immune response to bacterial infection. Immunol Res 2011;150:1-9.

148. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. Physiol Res 2006;55:667-74.

149. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I i sur. The gene encoding iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. J Clin Invest 2002;110:1037-44.

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

151. Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans *in vivo*: data from the HIGHCARE project. Blood 2011;117:2953-9.

152. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiogou D, Galani F, Apostolakou A, Ladis V i sur. The effect of erythropoetic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. Haematologica 2006;91:809-12.

153. Casanovas C, Vujić Spasić M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K i sur. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice Haematologica 2013;98:444–7.

154. Wilkinson N, Pantopoulos K. IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2α mRNA translation. Blood 2013;122:1658-68.

155. Ravasi G, Pelucchi S, Greni F, Mariani R, Giuliano A, Parati G i sur. Circulating factors are involved in hypoxia-induced hepcidin suppression. Blood Cells Mol Dis 2014;53:204-10.

156. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E i sur. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. Gut 2014;63:1951-9.

157. Lakhal S, Schödel J, Townsend ARM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR i sur. Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors. J Biol Chem 2011;286:4090-97.

158. Peyssonnaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH i sur. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). J Clin Invest 2007;117:1926–1932.

159. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. Blood 2008;111:924-31.

160. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases BMC Med Genomics 2009;2:2.

161. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002;82:47-95.

162. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2014. Available from: http://www.goldcopd.org/. Date last updated January 2014. Accessed July 24th 2014.

163. Sundeep S Salvi, Peter J Barnes Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers 2009;374:733–43.

164. Tajana Jalušić Glunčić The importance of understanding parameters of lung function in patients with chronic obstructive pulmonary disease Medicina Fluminensis Medicina Fluminensis 2012;48:179-85.

165. Cavaillès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S i sur. Comorbidities in COPD. Eur Respir Rev 2013;22: 454–75.

166. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wouters EF. Systemic inflammation in COPD: is genetic susceptibility a key factor? COPD 2006;3:51-61.

177. Oudijk EJ, Nijhuis EH, Zwank MD, van de Graaf EA, Mager HJ, Coffer PJ i sur. Systemic inflammation in COPD visualised by gene profiling in peripheral blood neutrophils. Thorax 2005;60:538-44.

168. Walter RE, Wilk JB, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF Jr, Lipinska I i sur. Systemic inflammation and COPD: the Framingham Heart Study. Chest 2008;133:19-25.

169. Koutsokera A, Stolz D, Loukides S, Kostikas K. Systemic biomarkers in exacerbation of COPD: Evolving clinical challenge. Chest 2012;141:396-405.

170. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P i sur. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. Chest 2007;131:37-43.

171. Agustí A, Faner R. Systemic inflammation and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2012;9:43-6.

172. Cavalcante AGM, Carvalhedo de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. AbstractJ Bras Pneumol J Bras Pneumol. 2009;35:1227-37.

173. Mak JC. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. Int J Tuberc Lung Dis 2008;12:368-74.

174. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2011;6:413-21.

175. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur J Pharmacol 2001;429:195-207.

176. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. Cell Biochem Biophys 2005;43:167-88.

177. Kim S, Nadel JA. Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. Treat Respir Med 2004;3:147-59.

178. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J i sur. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. J Biol Chem 2000;275:27258-65.

179. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2011;6:413-21.

180. Ghio AJ, Hilborn ED, Stonehuerner JG, Dailey LA, Carter JD, Richards JH i sur. Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect. Am J Respir Crit Care Med 2008;178:1130-8.

181. Ghio AJ, Hilborn ED, Stonehuerner JG, Dailey LA, Carter JD, Richards JH i sur. Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect.Am J Respir Crit Care Med 2008;178:1130-8.

182.Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005;2:373–385.

183. Fischer BM, Domowicz DA, Zheng S i sur. Neutrophil elastase increases airway epithelial nonheme iron levels. Clin Transl Sci 2009;2:333–339.

184.Ghio AJ, Turi JL, Yang F, Garrick LM, Garrick MD. Iron homeostasis in the lung. Biol Res 2006;39:67-77.

185. Tudorić N, Kuzman I. Azitromicin u liječenju akutnih egzacerbacija kronične opstruktivne plućne bolesti. Medicus 2008;17:37 - 43.

186. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R i sur. Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N Engl J Med 2010;363:1128-38.

187. Sethi S, Mahler DA, Marcus P, Owen CA, Yawn B, Rennard S. Inflammation in COPD: implications for management. Am J Med 2012;125:1162-70.

188. Rakušić N. Akutne egzacerbacije kronične opstruktivne plućne bolesti (AEKOPB) – smjernice i racionalno liječenje antibioticima. Medicus 2013;22:97-102.

189. Wouters EF, Groenewegen KH, Dentener MA, Vernooy JH. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations Proc Am Thorac Soc 2007; 4:626-34.

190. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. Eur Respir J 2009. 33:1165-85.

112. Smilovski T, Agusti A, MacNee W, Schonhofer B. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD. Eur Respir J 2006;27:390-6.

192. Kollert F, Tippelt A, Muller C, Jorres RA, Porzelius C, Pfeifer M i sur. Hemoglobin levels above anemia thresholds are maximally predictive for long-term survival in COPD with chronic respiratory failure. Respir Care 2013;58:1204-12.

193. Botou AK, Pitsiou GG, Stanopoulos I, Kontakiotis T, Kyriazis G, Argyropoulou P. Levels of inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease patients with anemia of chronic disease: a case-control study. QJM 2012;105:657-63.

194. Markoulaki D, Kostikas K, Papatheodoru G, Koutsokera A, Alchanatis M, Bakakos P i sur. Hemoglobin, erythropoietin and systemic inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Eur J Intern Med 2011;22:103-7.

195. Kollert F, Müller C, Tippelt A, Jörres RA, Heidinger D, Probst C i sur. Anaemia in chronic respiratory failure. Int J Clin Pract 2011;65:479-86.

196. Gagliardo B, Kubat N, Faye A, Jaouen M, Durel B, Deschemin JC i sur. Pro-hepcidin is unable to degrade iron exporter ferroportin unless maturated by furin-dependent process. J Hepatol 2009;50:394-401.

197. Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;291:L417-25.

198. Fraizer MD, Mamo LB, Ghio AJ, Turi JL. Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon-γ. Respir Res 2011;12:100.

199. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. J Clin Epidemiol 1994;47:1245-51.

200. Popovic Grle S. Alergijske bolesti i pušanje. Acta Med Croatica 2011;65:141-146.

201. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: ba result of 'overspill' of inflammatory mediatorsbfrom the lungs? Review of the evidence. Thorax *Thorax* 2010**;**65**:**930-936.

202. Khan FA, Fisher MA, Khakoo RA. Association of hemochromatosis with infectious diseases: expanding spectrum. Int J Infect Dis 2007;11:482-7.

203. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. Blood 2007;110:2182-89.

204. Kitsati N, Liakos D, Ermeidi E, Mantzaris MD, Vasakos S, Kyratzopoulou E. Rapid elevation of transferrin saturation and serum hepcidin concentration in hemodialysis patients after intravenous iron infusion. Haematologica. 2015;100:e80-3.

205. Nakagawa M, Terashima T, D'yachkova Y, Bondy GP, Hogg JC, van Eeden SF. Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. Circulation 1998;98:2307-13.

206. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. Blood 1995;86:3181-8.

207. Lazovic B. Correlation of CRP and serum level of fibrinogen with severity of disease in chronic obstructive pulmonary disease patients. Med Arch 2012;66:159-60.

208. Duvoix A, Dickens J, Haq I, Mannino D, Miller B, Tal-Singer R, Lomas DA. Blood fibrinogen as a biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 2013;68:670-6.

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

210. Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff AK i sur. Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. PLoS One 2009;4(11):e7875.

211. Kroot JJC, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. Clin Chem 2011:57:12 1650-69.

212. Carroz KP. Anemia in COPD: should it be taken into consideration? Arch Bronconeumol 2007;43:392-8.

213. McCranor BJ, Kim MJ, Cruz NM, Xue QL, Berger AE, Walston JD i sur. Interleukin-6 directly impairs the erythroid development of human TF-1 erythroleukemic cells. Blood Cells Mol Dis 2014;52:126-133.

214. Gardenghi S, Renaud TM, Meloni A, Casu C, Crielaard BJ, Bystrom LM i sur. Distinct roles for hepcidin and interleukin-6 in the recovery from anemia in mice injected with heat-killed Brucella abortus. Blood 2014;123:1137-45.

215. Rhodes CJ, Howard LS, Busbridge M, Ashby D, Kondili E, Gibbs JS i sur. Hypertension, Iron Deficiency and Raised Hepcidin in Idiopathic Pulmonary Arterial. J Am Coll Cardiol 2011;58:300-309.

216. Cristóvão C[1], Cristóvão L, Nogueira F, Bicho M. Evaluation of the oxidant and antioxidant balance in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Rev Port Pneumol 2013;19:70-5.

217. Rumora L, Rajković MG, Kopčinović LM, Pancirov D, Čepelak I, Grubišić TŽ. Paraoxonase 1 activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. COPD 2014;11:539-45.

218. Rahman I, Swarska E, Henry M, Stolk J, MacNee W. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? Thorax 2000;55:189-93.

219. Loban A, Kime R, Powers H. Iron-binding antioxidant potential of plasma albumin. Clin Sci (Lond) 1997; 93:445-51.

220. Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects. *Diabetes* 2014;63(3):976-981.

221. Bartziokas K, Papaioannou AI, Loukides S, Papadopoulos A, Haniotou A, Papiris S, Kostikas K. Serum uric acid as a predictor of mortality and future exacerbations of COPD. Eur Respir J 2014;43:43-53.

222. Lopez IH. Serum uric acid levels among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 2003;124 (4 Meeting Abstracts):168S-a.

223. Schwertner HA. Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations. Atherosclerosis 1998;136:383–7.

224. Jo J, Kimm H, Yun JE, Lee KJ, Jee SH. Cigarette smoking and serum bilirubin subtypes in healthy Korean men: the Korea Medical Institute study. J Prev Med Public Health 2012;45:105-12.

225. Villard PH, Herber R, Seree EM, Attolini L, Magdalou J, Lacarelle B. Effect of cigarette smoke on UDP-glucuronosyltransferase activity and cytochrome P450 content in liver, lung and kidney microsomes in mice. Pharmacol Toxicol 1998;82:74–79.

226. Schneckenpointner R, Jörres RA, Meidenbauer N, Kollert F, Pfeifer M, Budweiser S. The clinical significance of anaemia and disturbed iron homeostasis in chronic respiratory failure. Int J Clin Pract 2014;68:130-8.

227. Urban M, Burghuber OC, Hübl W, Funk GC. Iron deficiency in non-anemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Resp J 2011;38:2937.

228. Macdougall IC, Malyszko J, Hider RC, Bansal SS. Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2010;5:1681-9.

8. POPIS KRATICA

AEKOPB akutna egzacerbacija kronične opstrukcijske plućne bolesti

AKB anemija kronične bolesti

ALP alkalna fosfataza

ALT alanin-amino transferaza

AST aspartat-amino transferaza

BMI indeks tjelesne mase

BMP koštani morfogenetski protein **(**eng. bone morphogenic protein)

CRP C-reaktivni protein

DMT-1 transporter dvovalentnih metala 1 (engl. divalent metal transporter 1)

DTNB 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina

DyctB duodenalni citokrom B

eGFR procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate)

EPO eritropoetin

ESCRT endosomalni sortirajući kompleks zadužen za transport (engl. endosomal sorting complex required for transport)

FEV1 forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi

FVC forsirani vitalni kapacitet

GAPDH gliceraldehid-fosfat dehidrogenaza

GDF15 faktor rasta i diferencijacije 15 **(**engl. growth differentiation factor 15)

GOLD Globalna inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest **(**engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)

HCP-1 protein nosač hema 1 (engl. heme-carrier protein 1)

HFE protein nasljedne hemokromatoze (engl. hereditaryhemochromatosis protein)

HIF faktor induciran hipoksijom (engl. hypoxia inducible factors)

HJV	hemojuvelin
HO-1	hem-oksigenaza 1
HRE	element koji odgovora na stanje hipoksije (engl.hypoxiaresponsive element)
IL-6	interleukin 6
IRE	element koji odgovora na željezo (engl. iron responsive element)
IRP	željezom regulirani proteini (engl. iron responsive protein)
JAK	Janus kinaza
KOPB	kronična opstrukcijska bolest pluća
LEAP	antimikrobni peptid eksprimiran u jetri (engl. liver-expressed antimicrobial peptide)
LIP	labilni odjeljak željeza (engl. labile iron pool)
LTOT	dugotrajna terapija kisikom (engl. long term oxygen therapy)
MMP	matriksna metaloproteinaza
NTBI	željezo nevezano za transferin (engl. non transferrin bind iron)
PAH	plućna arterijska hipertenzija
PaO_2	parcijalni tlak O_2
PCFT	transporter za folat i proton (engl. proton coupled folate transporter)
PDGF-BB	faktor rasta BB porijeklom iz trombocita (engl. platelet derived growth factor-BB)
PI-PCL	fosfolipaza C specifična za fosfatidil-inozitol
RES	retikulo-endotelni sustav
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. reactive oxygen species)
Rtc	retikulociti
SaO_2	zasićenje hemoglobina kisikom
sHJV	topivi hemojuvelin
STAT	prenositelj signala i aktivator transkripcije **(**engl. signal transducer and activators of transcription)

STEAP protein prostate 3 sa šest transmembranskih područja (engl. sixtransmembrane prostate protein 3)

sTfR topivi transferinski receptori

TfR1 transferinski receptor tipa 1

TfR2 transferinski receptor tipa 2

TIBC ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. total iron binding capacity)

TNB 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

TNFα faktor tumorske nekroze α (engl. tumor necrosis factor α)

UIBC nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. unsaturated iron binding capacity)

3´-UTR 3´ netranslatirajuća regija **(**engl. 3´-untranslated region)

5´-UTR 5´ netranslatirajuća regija (engl. 5´-untranslated region)

9. ŽIVOTOPIS

Leida Tandara rođena je 3. svibnja 1969. godine u Delnicama gdje je polazila i osnovnu školu. U Rijeci je 1988. godine završila Centar usmjerenog obrazovanja za kadrove u zdravstvu stekavši zvanje sanitarno-laboratorijskog tehničara. Iste godine upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje je 1993. godine diplomirala i stekla naslov diplomiranog inžinjera medicinske biokemije. Poslijediplomski studij iz medicinske biokemije upisala je 1994. godine.

Od 1994. do 2003. godine radila je kao voditelj laboratorija u Domu zdravlja ″Dr. Josip Kajfeš″ u Delnicama. U Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split radi od 2003. godine, a specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila je 2010. godine. Od 2014. godine radi na mjestu pročelnika Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split. Od 2004. godine, kao vanjski suradnik, sudjeluje u nastavi na Medicinskom fakultetu u Splitu i na Katedri za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku na Zdravstvenom studiju Sveučilišta u Splitu, a 2014. godine na istoj katedri izabrana je u zvanje predavača.

Aktivni je član Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku i Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova.

Popis znanstvenih i stručnih članaka:

1. Tandara L, Zanić Grubisic T, Gudelj I, Jurisic Z, Tandara M, Gugo K, Mladinov S, Salamunic I. Systemic inflammation up-regulates serum hepcidin in exacerbations and stabile chronic obstructive pulmonary disease. Clin Biochem 2015;48:1252-7.

2. Plestina-Borjan I, Katusic D, Medvidovic-Grubisic M, Supe-Domic D, Bucan K, Tandara L, Rogosic V. Association of age-related macular degeneration with erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum total antioxidant status. Oxid Med Cell Longev 2015: Article ID 804054.

3. Tandara M, Bajic A, Tandara L, Bilic-Zulle L, Sunj M, Kozina V, Goluza T, Jukic M. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. Andrology 2014;5:678-86.

4. Sunj M, Kasum M, Canic T, Karelovic D, Tandara M, Tandara L, Palada I. Assessment of ovarian reserve after unilateral diathermy with thermal doses adjusted to ovarian volume. Gynecol Endocrinol 2014;30:785-8.

5. Jurisic Z, Martinovic-Kaliterna D, Marasovic-Krstulovic D, Perkovic D, Tandara L, Salamunic I, Carevic V. Relationship between interleukin-6 and cardiac involvement in systemic sclerosis. Rheumatology 2013;52:1298-302.

5. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future decisions. Biochem Med 2012;22:311-28.

6. Salamunić I, Pauković Sekulić B, Galetović A, Tandara L, Martinović Kaliterna D. Usporedba testa AtheNA Multi-Lyte ANA za određivanje autoantitijela s indirektnom imunofluorescencijom i testom ELISA. Biochemia Medica. 2010;20:45-56.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

UTJECAJ SISTEMSKE UPALE NA HOMEOSTAZU ŽELJEZA U EGZACERBACIJI I STABILNOJ FAZI KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

Leida Tandara

Uvod: Glavni regulator sistemske homeostaze željeza je hepcidin, čiju sintezu reguliraju status željeza, upalni citokini, eritropoetska aktivnost, hipoksija i anemija. Cilj ovoga rada bio je ispitati povezanost između serumskog hepcidina i čimbenika koji ga reguliraju u skupini bolesnika s KOPB-om, da bi se ispitalo kako ovi čimbenici utječu na koncentraciju hepcidina i osiguravanje opskrbe željezom neophodnim za eritropoezu. Hipoteze istraživanja: koncentracija hepcidina u serumu bolesnika s KOPB-om promijenjena je u odnosu na kontrolnu skupinu i mijenja se tijekom egzacerbacije u odnosu na stabilnu fazu bolesti; na koncentraciju hepcidina u KOPB-u utječu upala i/ili hipoksija.

Metode i ispitanici: U istraživanje je bilo uključeno 40 bolesnika s KOPB-om i 30 zdravih ispitanika. U KOPB-u skupini parametri su longitudinalno praćeni u tri vremenske točke: u egzacerbaciji, fazi rezolucije i stabilnoj fazi bolesti. Svim ispitanicima određena je koncentracija hepcidina, pokazatelja statusa željeza (serumsko željezo, TIBC, saturacija transferina, feritin); pokazatelja upale (broj leukocita i neutrofilnih granulocita, IL-6 i CRP-a), eritropoetske aktivnosti (broj retikulocita, topivi transferinski receptor i eritropoetin) i koncentracija hemoglobina. Svim bolesnicima s KOPB-om određeni su parcijalni tlak kisika i saturacija hemoglobina kisikom kao pokazatelji hipoksije.

Rezultati: Serumska koncentracija hepcidina bila je povišena u egzacerbaciji i stabilnoj fazi KOPB-a u odnosu na kontrolnu skupinu, te je pozitivno korelirala s IL-6 i CRP-om. Koncentracija hepcidina je bila pozitivno povezana s feritinom i negativno s TIBC-om. Eritropoetska aktivnost, mjerena apsolutnim brojem retikulocita bila je u svim fazama istraživanja niža od kontrolne skupine, a negativna povezanost je pokazana u egzacerbaciji. Koncentracija hepcidina nije bila povezana s parametrima hipoksije. U kontrolnoj skupini hepcidin je korelirao samo s pokazateljima statusa željeza, negativno s TIBC-om i pozitivno s feritinom.

Zaključak: Istraživanje je pokazalo da prisutna sistemska upala i povišena razina IL-6 u egzacerbaciji i stabilnoj fazi KOPB-a mogu biti odgovorne za opaženi porast koncentracije hepcidina. Porast koncentracije hepcidina mogao bi biti povezan s restriktivnom eritropoezom koja se očituje sniženim brojem retikulocita u svim fazama istraživanja, kao i snižavanju koncentracije hemoglobina u stabilnoj fazi bolesti. Dobiveni rezultati pružaju uvid u dinamičke promjene metabolizma željeza i povezanosti s razinom hepcidina. Sistemska upala prisutna kod velikog broja bolesnika s KOPB-om jača kako bolest napreduje, te bi porast razine IL-6 mogao voditi do daljnjeg porasta koncentracije hepcidina.

Broj stranica: 103; broj slika: 29; broj tablica: 9; literaturnih navoda 228, izvornik je na hrvatskom jeziku.

Rad je pohranjen: u centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ključne riječi : hepcidin, COPD, interleukin-6, sistemska upala, metabolizam željeza

Mentorica: prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Lada Rumora

prof. dr. sc. Karmela Barišić

izv. prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle

Rad je prihvaćen dana: 24. veljače 2016.g.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry Doctoral thesis

INFLUENCE OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON IRON HOMEOSTASIS DURING EXACERBATION AND STABILE CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Leida Tandara

Background: Hepcidin is the main regulator of systemic iron homeostasis, and its expression is modulated by iron status, hypoxia, erythroid factors and inflammation. The aim of this study was to examine a relationship between level of hepcidin and iron status, erythropoietic activity, hypoxia and inflammation in exacerbations and stable COPD. We hypothesized that hepcidin concentration is changed compared to control group and is changing in acute exacerbation compared to stable COPD; hepcidin concentration is substantially influenced by inflammation and/or hypoxia.

Methods: The study included 40 COPD patients and 30 healthy subjects. In COPD group parameters were longitudinally monitored at three time points: at exacerbation, on resolution and in stable disease. We determined concentration of hepcidin and hemoglobin; parameters of iron status: serum iron, total iron binding capacity (TIBC), ferritin and calculated transferrin saturation. Soluble transferrin receptors, reticulocyte number (Rtc), and regulatory hormone erythropoietin were measured as indicators of erythropoietic activity. Systemic inflammation was assessed by determination of CRP, IL-6, and number of white blood cells and neutrophils. In COPD group partial oxygen pressure and haemoglobin oxygen saturation were determined.

Results: Hepcidin was elevated in exacerbations and in a stable phase compared to the control group and we found positive correlations of hepcidin with inflammatory markers IL-6 and CRP. Hepcidin also correlated positively with ferritin and inversely with TIBC. Erythropoietic activity, measured by absolute Rtc number, was significantly reduced in COPD compared to the control group in all study phases, and negative correlation with hepcidin was established in exacerbation. In exacerbation and stable disease hepcidin correlated with ferritin and TIBC. No correlations were observed with indices of hypoxia. In the control group, positive associations were observed only with indices of iron status, positive with ferritin and negative one with TIBC.

Conclusion: This study shows that elevated values of IL-6 present in exacerbations and stabile COPD might be responsible for the observed increased hepcidin level. These might be associated with restricted erythropoiesis as shown by lower number of reticulocytes and decreased level of haemoglobin at the stable phase. The results obtained might provide new insights into dynamic changes of iron metabolism and its relation to hepcidin level in COPD. Systemic inflammation present in majority of COPD patients increases over time as disease progresses so raising of IL-6 level could lead to further up-regulation of hepcidn.

Number of pages: 103; number of figures: 29; number of tables: 9; number of references 228, the original is written in Croatian

Keywords: hepcidin, COPD, interleukin-6, systemic inflammation, iron metabolism

Supervisor: Full Professor Tihana Žanić Grubišić, PhD

Reviewers: Full Professor Lada Rumora, PhD
Full Professor Karmela Barišić PhD
Associate Professor Sanja Popović-Grle, PhD

Accepted: 24th January 2016.