

**UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO**

**POMEN DOLOČEVANJA RETIKULOCITNEGA EKVIVALENTA  
HEMOGLOBINA PRI BOLNIKI Z ANEMIJO**

Diplomska naloga

Študentka: Marija Lesjak

Študijski program: univerzitetni, Kemijska tehnologija

Smer: Biokemijska tehnika

Mentorica: doc. dr. Marjana Glaser, dr.med.

Somentor: Aleš Goropevšek, dr.med.

Maribor, februar 2009

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih avtorjev so v nalogi citirani in podani v spisku uporabljene literature in virov.

Podpis študentke:

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc.dr. Marjani Glaser in somentorju Alešu Goropevšku, dr.med., za strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju diplomske naloge.

Posebna zahvala velja tudi tistim sorodnikom in prijateljem, ki me zadnje čase niso veliko spraševali, kdaj bom končno diplomirala.

## POMEN DOLOČEVANJA RETIKULOCITNEGA EKVIVALENTA HEMOGLOBINA PRI BOLNIKIHZ ANEMIJO

**Ključne besede:** kri, anemija, metabolizem železa, mielodisplastični sindrom, retikulocitni ekvivalent hemoglobina

**UDK:** 611.018.1:615.155.16(043.2)

### POVZETEK

*Namen diplomske naloge je bil določitev novega hematološkega parametra RET He (retikulocitni ekvivalent hemoglobina) s pretočno citometrijo pri treh skupinah bolnikov z anemijo: bolnikov z anemijo zaradi pomanjkanja železa, bolnikov z anemijo zaradi pomanjkanja železa, ki so se zdravili s preparati železa in bolnikov z okvaro kostnega mozga (mielodisplastični sindrom), ki so anemični, ker kostni mozeg ne proizvaja dovolj rdečih krvnih celic ali pa so te nefunkcionalne (displastični). Dobljene vrednosti smo primerjali s klasičnimi hematološkimi (Hb, MCH, MCV, MCHC) in biokemijskimi (serumsko železo, feritin) kazalci pomanjkanja železa. Pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa so rezultati pokazali visoko korelacijo med RET He in hematološkimi parametri ( $r=0,83-0,92$ ). Med RET He in feritinom je nekoliko nižja (0,73). Najnižja je med RET He in serumskim železom (0,65). Pri bolnikih z MDS je zaradi kompleksnosti bolezni vrednost parametra RET He težje opredeljiva.*

## **MEANING OF DETERMINATION OF RETICULOCYTE HEMOGLOBIN EQUIVALENT IN THE DIAGNOSIS OF ANEMIA**

**Key words: blood, anemia, iron metabolism, myelodysplastic syndrome,  
reticulocyte hemoglobin equivalent**

**UDK: 611.018.1:615.155.16(043.2)**

### **ABSTRACT**

*The purpose of my diploma thesis was to determine the new hematological parameter of RET He (reticulocyte hemoglobin equivalent) with the help of the flow cytometry. We determined it at three groups of anemic patients: patients with iron deficiency anemia, patients with iron deficiency anemia who were healed by iron, and the patients who have damaged bone marrow (myelodysplastic syndrome) and are anemic because the bone marrow does not produce enough red blood cells or the cells are dysfunctional. Gained values were compared to classical hematological (Hb, MCH, MCV, MCHC) and biochemical (serum iron and ferritin) indicators of iron deficiency. Results at patients with iron deficiency anemia showed high correlation between med RET He and hematological parameters ( $r=0,83-0,92$ ). Correlation between RET He and ferritin is lower (0,73). The lowest is between RET He and serum iron (0, 65). At MDS patients the value of the parameter is hard to define because of complexity of the illness.*

## KAZALO VSEBINE

1. UVOD .....	2
2. TEORETIČNI DEL.....	3
2.1 Kri.....	3
2.1.1 Matične krvne celice .....	5
2.1.1.1 Krvotvorne ali hematopoetske matične celice.....	6
2.1.1.2 Hemopoeza.....	7
2.1.1.3 Viri krvotvornih matičnih celic .....	9
2.1.2 Rdeče krvne celice .....	9
2.1.2.1 Nastajanje eritrocitov - eritropoeza .....	10
2.1.2.2 Zgradba eritrocitov .....	11
2.1.2.3 Delovanje eritrocitov.....	12
2.1.2.4 Razgradnja eritrocitov .....	15
2.2 Fiziološka vloga železa v človeškem telesu .....	15
2.2.1 Vloga železa v eritropoezi .....	16
2.2.2 Kroženje železa v človeškem telesu.....	16
2.2.3 Sprostitev železa iz ostarelih eritrocitov .....	17
2.2.4 Zaloge železa v telesu .....	17
2.2.5 Prehod železa v celico .....	18
2.2.6 Viri železa v živilih .....	19
2.2.7 Absorbcija železa iz hrane.....	20
2.2.7.1 Snovi, ki vplivajo na absorbcijo železa .....	21
2.2.7.2 Potek absorbcije .....	22
2.2.7.3 Regulacija absorbcije železa .....	23
2.2.8 Izločanje železa .....	24
2.2.9 Pomanjkanje železa .....	24
2.2.9.1 Absolutno in funkcionalno pomanjkanje železa .....	25
2.2.10 Preobremenitev z železom .....	25
2.3 Anemije .....	26
2.3.1. Vzroki za nastanek anemij .....	26
2.3.1.1 Prilagoditve telesa na zmanjšano sposobnost krvi, da prenaša kisik .....	26
2.3.1.2 Najpogostejši znaki in simptomi anemije .....	26
2.3.2 Razvrstitev anemij.....	28
2.3.3. Mikrocitne anemije .....	28
2.3.4 Makrocitne anemije.....	29
2.3.4.1 Megaloblastba anemija.....	29
2.3.5 Normocitne anemije .....	30
2.3.5.1. Hemolitične anemije .....	30
2.3.5.2. Aplastična anemija .....	31
2.3.5.3. »Čista« aplastična anemija .....	31
2.3.5.4. Anemije pri kronični bolezni.....	31
2.3.6 Anemije zaradi drugih vzrokov .....	32
2.3.6.1 Anemije zaradi pomanjkanja beljakovin v hrani.....	32
2.3.6.2 Anemije v nosečnosti .....	32
2. 4 Anemija zaradi pomanjkanja železa.....	32
2. 4. 1 Patogeneza anemije zaradi pomanjkanja železa.....	32
2.5 Mielodisplastični sindromi (MDS).....	33

---

2.5.1 Vrste mielodisplastičnih sindromov.....	36
2.5.2 Diagnoza mielodisplastičnih sindromov glede na spremembe v krvi in krvnem mozgu	36
3. EKSPERIMENTALNI DEL .....	38
3.1 Hematološki analizator Sysmex 2100 Xe .....	38
3.1.1 Merilni princip.....	39
3.2 Pomen hematoloških kazalcev in principi meritev .....	40
3.2.1 Določevanje številčne koncentracije eritrocitov v krvi.....	41
3.2.2 Določevanje koncentracije hemoglobina v krvi.....	42
3.2.3 Določevanje hematokritne vrednosti HCT v krvi .....	42
3.2.4 Določevanje MCV v krvi .....	43
3.2.5 Določevanje MCHC v krvi .....	43
3.2.6 Določevanje MCH.....	44
3.3 Analiza retikulocitov .....	44
3.3.1 Številčna vrednost retikulocitov .....	45
3.4 Klinični pomen določevanja retikulocitnega ekvivalenta hemoglobina .....	46
RET He za oceno pomanjkanja železa v telesu.....	46
3.4.1 Princip meritve .....	48
3.4 Pomen biokemijskih kazalcev in principi meritev .....	49
3.4.1 Določevanje železa v krvnem serumu.....	49
3.4.2 Določevanje feritina v krvnem serumu .....	50
4. REZULTATI Z DISKUSIJO .....	52
4.1 Rezultati meritev pri nezdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa..	52
4.2 Rezultati meritev pri zdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa .....	52
4.3 Rezultati meritev pri bolnikih z MDS .....	53
4.4 Vrednotenje rezultatov .....	54
4.4.1 Nezdravljeni bolniki z anemijo, zaradi pomanjkanja železa.....	54
4.4.2 Zdravljeni bolniki z anemijo .....	56
4.4.3 Bolniki z MDS .....	59
4.4.4 Primerjava povprečnih vrednosti RET He pri vseh treh skupinah bolnikov.....	61
4.5 Statistična obdelava podatkov .....	61
4.5.1 Statistična obdelava podatkov s Pearsonovo korelacijo.....	61
4.5.2 Statistična obdelava podatkov s t-testom. ....	63
5.ZAKLJUČEK.....	64
6. UPORABLJENI VIRI IN LITERATURA .....	65

## KAZALO SLIK

Slika 2.1: Sestava krvi .....	5
Slika 2.2: Diferenciacija krvotvornih matičnih celic.....	8
Slika 2.3: Eritropoeza .....	10
Slika 2.4: Slika hemoglobina in hema .....	12
Slika 2.5: Absorbcija železa iz hrane .....	20
Slika 3.1 Hematološki analizator Sysmex 2100 Xe.....	36
Slika 3.2: Krvna slika s pomočjo računalniškega programa.....	37
Slika 3.3: Primerjava RET He s hematološkimi in biokemijskimi parametri pred in po zdravljenju z intravenoznim železom .....	44
Slika 3.4 : Določevanje RET-He na Sysmex-2100 Xe z merjenjem intenzivnosti razpršene laserske svetlobe pod majhnim kotom. ....	45
Slika 4.1: Vrednosti RET He pri nezdravljenih bolnikih z anemijo v .....	50
Slika 4.2: Vrednosti serumskega železa pri nezdravljenih bolnikih z anemijo .....	51
Slika 4.3: Vrednosti feritina pri nezdravljenih bolnikih z anemijo .....	52
Slika 4.4: Vrednosti RET He pri zdravljenih bolnikih z anemijo.....	52
Slika 4.5: Vrednosti serumskega železa pri zdravljenih bolnikih.....	53
Slika 4.6: Vrednosti feritina pri zdravljenih bolnikih .....	54
Slika 4.7: Vrednosti RET He pri bolnikih z MDS.....	55
Slika 4.8: Vrednosti serumskega železa pri bolnikih z anemijo.....	56
Slika 4.9: Vrednosti feritina pri bolnikih z MDS.....	56
Slika 4.10: Povprečne vrednosti RET He pri vseh treh skupinah bolnikov glede na referenčne vrednosti.....	57



**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 3.1: Vsebnost železa v živili.....	19
Preglednica 4.1: Izmerjeni hematološki parametri pri nezdravljenih bolnikih.....	48
Preglednica 4.2: Izmerjeni biokemijski parametri pri nezdravljenih bolnikih.....	48
Preglednica 4.3: Izmerjeni hematološki parametri pri zdravljenih bolnikih.....	48
Preglednica 4.4: Izmerjeni biokemijski parametri pri zdravljenih bolnikih .....	49
Preglednica 4.5: Izmerjeni hematološki parametri pri bolnikih z MDS .....	49
Preglednica 4.6: Izmerjeni biokemijski parametri pri bolnikih z MDS .....	49
Preglednica 4.7: Eritrocitni parametri pri nezdravljenih bolnikih.....	50
Preglednica 4.8: Eritrocitni parametri pri zdravljenih bolnikih.....	53
Preglednica 4.9: Eritrocitni parametri pri bolnikih z MDS .....	55
Preglednica 4.10: Statistični podatki .....	58
Preglednica 4.11: Statistični podatki pri bolnikih z MDS .....	58
Preglednica 4.12: Vrednosti RET He po skupinah ter njihove srednje vrednosti in razpon.....	59
Preglednica 4.13: Statistična obdelava podatkov s t-testom.....	59

**UPORABLJENI SIMBOLI**

L – lahka monomera

H – težka monomera

$\alpha$  – stopnja tveganja

r – faktor korelacije

$\mu$  – mikro ( $10^{-6}$ )

f – femto ( $10^{-15}$ )

p – piko ( $10^{-12}$ )

Fe – železo

r-HuEPO – humani rekombinantni eritropoetin

DNA – deoksiribonukleinska kislina

RNA – ribonukleinska kislina

RBC – število rdečih krvnih celic

MCV – povprečni volumen eritrocitov

MCHC – delež hemoglobina v povprečnem eritrocitu glede na njegovo celotno maso

MCH – povprečna vrednost hemoglobina v eritrocitu

FSC – sipanje svetlobe pod majhnim kotom

HCT – hematokritna vrednost

PLT – oznaka trombocitov

IRF – delež nezrelih retikulocitov

Ret – retikulociti absolutno

Ret-r – retikulociti relativno

RET He – retikulocitni ekvivalent hemoglobina

## UPORABLJENE KRATICE

Hb – hemoglobin

PVE – povprečni volumen eritrocitov

TR – transferinski receptor

KKS – kompletna krvna slika

DKS – diferencialna krvna slika

PMC – pluripotentne matične celice

MMC-M – multipotentne matične celice mieloične vrste

SMV – srčni minutni volumen

AA – aplastična anemija

AKB – anemija ob kronični bolezni

MDS – mielodisplastični sindrom

AML – akutna mieloična levkemija

RET – retikulocit

## 1.UVOD

Namen diplomske naloge je bil določitev novega hematološkega parametra RET He (retikulocitni ekvivalent hemoglobina) s pretočno citometrijo pri treh skupinah bolnikov z anemijo:

- bolnikov z mikrocitno anemijo zaradi pomanjkanja železa,
- bolnikov z mikrocitno anemijo zaradi pomanjkanja železa, ki so se zdravili s preparati železa,
- bolnikov z okvaro kostnega mozga (mielodisplastični sindrom), ki so anemični, ker kostni mozeg ne proizvaja dovolj eritrocitov ali pa so ti nefunkcionalni (displastični), zato morajo prejemati transfuzije.

Dobljene vrednosti smo primerjali s klasičnimi hematološkimi (RBC, Hb, MCV, MCHC, MCH) in biokemijskimi (serumsko železo, feritin) kazalci pomanjkanja železa.

Rezultati so pomemben podatek pri določanju funkcionalnega pomanjkanja celičnega železa, kjer gre za neravnovesje med potrebami in oskrbo kostnega mozga z železom. Predpostavljamo, da lahko s to metodo ocenimo ali je pri anemičnem bolniku, ki uživa preparate železa in ima sicer normalne ostale hematološke kazalce, koncentracija vnesenega železa dovoljšnja, da bolnik nima funkcionalnega pomanjkanja železa.

Anemija ali slabokrvnost je bolezensko stanje, kjer je zmanjšana celotna količina hemoglobina, kar je posledica bodisi primanjkljaja eritrocitov bodisi manjše količine hemoglobina v eritrocitih. Zaradi zmanjšane količine hemoglobina (Hb) se zmanjša sposobnost krvi, da prenaša kisik po krvnem obtoku do posameznih tkiv, ki ga nujno potrebujejo za normalno delovanje.

Hb je sestavljen iz beljakovinskega dela-globina in hema, ki daje barvo in vsebuje železo.[1]

Telo odraslega moškega vsebuje v povprečju 3,5 g železa, žensko telo pa okrog 2,9 g. Približno dve tretjini vsega železa je v hemoglobinu, večina ostalega pa je vezanega v feritin, beljakovinski kompleks, ki služi kot shramba železa. Pomanjkanje železa je najbolj razširjeno pomanjkanje hranilne snovi na svetu.[2]

## **2. TEORETIČNI DEL**

### **2.1 Kri**

Vsi telesni organi potrebujejo neprestano novih snovi, iz katerih črpajo energijo za svoje delovanje. V prebavilih se hrana tako predela, da jo celice lahko uporabljajo. Te predelane, oziroma prebavljene snovi jemlje iz prebavil kri in jih dobavlja predvsem mišicam, pa tudi drugim organom. Prav tako jemlje kri v pljučih iz vdihanega zraka kisik in ga oddaja celicam. Hkrati pa pobira kri iz celic razkrojnine, ki so "odpadni material" delovanja celic. Celicam so odveč in celo škodljivi. Kri odlaga razkrojnine deloma v pljučih (ogljikov dioksid in nekaj vode), mnogo več v koži (v znojnice), nekaj pa jih izloči skozi ledvice. Kri je torej prometno sredstvo, ki dovaža celicam potrebne snovi, nepotrebne pa odvaža. Ker je kri tekoča, poteka ta "transport" dokaj hitro. Žile so pot, po kateri se opravlja promet s krvjo, srce pa je motor, ki poganja kri po telesu. Razen tega pa je kri pomembna tudi zato, ker so v njej mnoge obrambne snovi, ki varujejo telo pred škodljivimi vplivi mikrobov ali pa mikrobe celo uničujejo.

Kri je rdeča tekočina, ki je nekoliko slana in lepljiva. V telesu odraslega človeka se stalno pretaka okoli 5-6 litrov krvi. Njen tekoči del je pravzaprav rumenkast in ga imenujemo krvna plazma.[3]

Človeško kri gradijo naslednje sestavine

- krvni serum (56%) (krvna plazma skupaj z beljakovino fibrinogenom):
  - voda (~92%)
  - beljakovine (albumin, fibrinogen, protitelesa, faktorji strjevanja krvi, drugi encimi...) (6-8%)
  - soli (0,8%)
  - lipidi (0,6%)
  - ogljikovi hidrati (natančneje glukoza; 0,1%)
  - hormoni in minerali

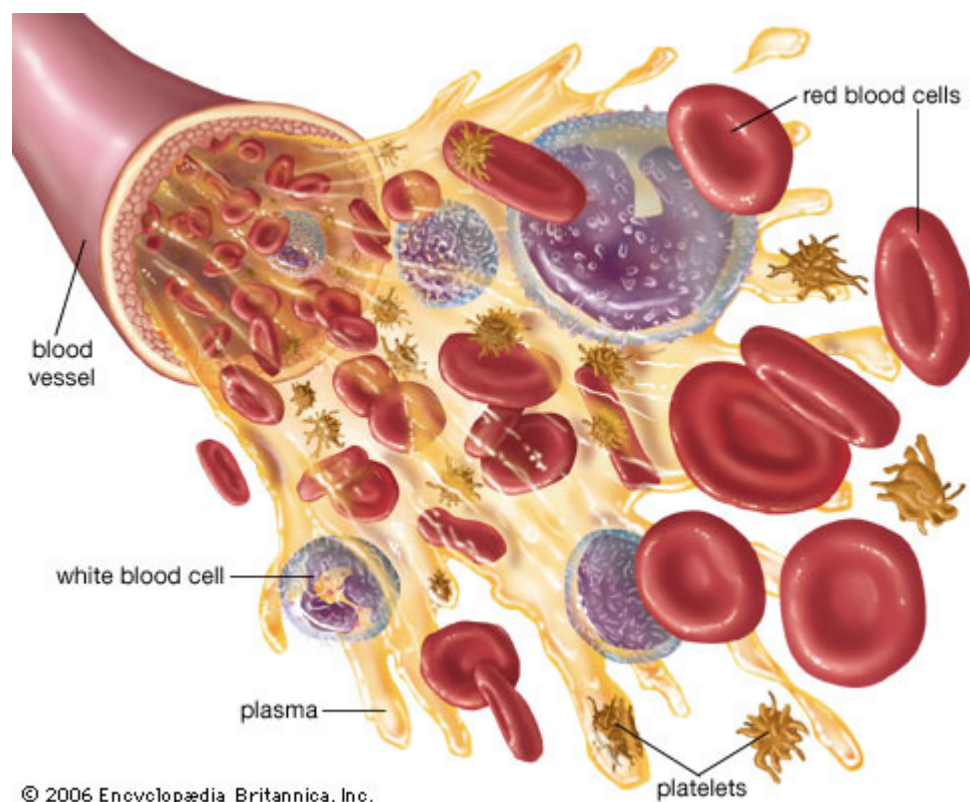
- krvne celice (44%)
  - rdeče krvničke ali eritrociti
  - bele krvničke ali levkociti
  - krvne ploščice ali trombociti

Bele krvničke, levkociti ali krvne celice bele vrste so krvne celice, ki varujejo telo pred okužbami in tumorji, se pravi pred mikroorganizmi in tujimi beljakovinami. Normalno je v litru krvi od  $4 \cdot 10^9$  do  $11 \cdot 10^9$  levkocitov.

Krvne ploščice ali trombociti so krvne celice, ki mašijo rane na organizmu in s tem preprečujejo prevelike izgube krvi. V kubičnem milimetru ( $\text{mm}^3$ ) krvi je od 150,000 do 300,000 trombocitov, od tega je 40% v vraničnem krvnem obtoku. V krvnem obtoku preživijo od 8 do 10 dni, nato pa jih odstranijo makrofagi. Krvne ploščice pravzaprav niso prave celice, temveč le ovitki celične membrane, v katerih so različne snovi, ki ob poškodbi reagirajo z drugimi snovmi v krvi. Nastajajo torej kot drobcji večjih celic, imenovanih megakariociti. Pri slednjih z zorenjem citoplazme nastajajo zrnca (granule), mešički (vezikule) z lizosomnimi granulami in sistem demarkacijskih membran, ki razmejujejo citoplazmo, iz katere nastanejo trombociti.[4]

Rdeča krvna telesa ali eritrociti dajejo krvi rdečo barvo. To so ploščice, z obeh strani nekoliko vderte (s premerom 7,5 mikrona), in so brez jedra. Rdečo barvo jim daje posebno barvilo hemoglobin. Hemoglobin ima to zmožnost, da se zelo rad, toda rahlo veže s kisikom. To se dogaja v pljučih, kjer prihajajo eritrociti v stik z vdihanim zrakom. Ko hemoglobin sprejme kisik, postane kri svetlo rdeča. V celicah pa, kjer je manj kisika, odda kri kisik in sprejme ogljikov dioksid; pri tem postane temno rdeča. Eritrociti oskrbujejo torej celice s kisikom.

V človeški krvi je okoli 5 milijonov eritrocitov v  $1 \text{ mm}^3$ . Ker te celice nimajo jedra, ne živijo dolgo, kvečjemu 120 dni, nato pa odmro. Odmrle eritrocite odlaga kri predvsem v vranici, kjer razpadejo. Novi eritrociti nastajajo neprestano v rdečem kostnem mozgu ploščatih kosti.[4]



Slika 2.1: Sestava krvi [5]

### 2.1.1 Matične krvne celice

Krvotvorne matične celice so nespecializirane celice, z dolgoročno zmožnostjo delitve in obnove ter zmožnostjo diferenciacije v krvne celice in celice imunskega sistema ter v možganske celice, hepatocite, mišične celice ali celice endotelija. Identificiramo in izoliramo jih s pomočjo celičnih označevalcev, ki se pojavijo na celični površini. Najznačilnejši celični označevalec za te celice je površinski glikoprotein CD34.

Glede na sposobnost diferenciacije ločimo več vrst matičnih celic. Totipotentne matične celice predstavlja zigota in osem celic, ki nastanejo po prvih treh celičnih delitvah. Iz njih se lahko razvijejo vse celice človeškega organizma. Pluripotentne matične celice so potomke totipotentnih celic (50 embrionalnih celic znotraj blastociste). Tvorijo lahko večino različnih celičnih vrst, ne morejo pa več samostojno izdelati vseh tkiv, potrebnih za popoln razvoj

ploda. Multipotentne matične celice se lahko delijo le v njim podobne specializirane celice, saj so že delno diferencirane in s tem razvojno omejene.

Progenične (unipotentne) matične celice se lahko delijo le v eno celično vrsto. Imajo še možnost samoobnove, kar jih ločuje od nematičnih celic [6].

Glede na izvor pa ločimo dve vrsti matičnih celic. Embrionalne matične celice so celične kulture pridobljene iz nediferencirane notranje mase blastociste. Za uporabo teh celic v terapevtske namene je mnogo etičnih zadržkov. Somatske ali »odrasle« matične celice pa so večinoma nediferencirane celice v tkivu ali organu, ki se nahajajo med diferenciranimi. Večinoma so to multipotentne celice. V uporabi so za zdravljenje več kot sto različnih bolezni in bolezenskih stanj. Somatske matične celice navadno tvorijo vrsto celic iz tkiva, v katerem se nahajajo. Glavna naloga somatskih matičnih celic v živem organizmu je, da vzdržujejo in popravljajo organ, v katerem se nahajajo. Imajo sposobnost samoobnove. Njihov izvor v tkivu je neznan [7].

V kostnem mozgu se nahajata dve vrsti somatskih matičnih celic:

- stromalne matične celice kostnega mozga, iz katerih se tvori kostnina, hrustanec, maščoba in vezivno tkivo ter
- krvotvorne matične celice. [8]

### *2.1.1.1 Krvotvorne ali hematopoetske matične celice*

Krvotvorne matične celice so celice, iz katerih se razvijejo vse krvne celice in celice imunskega sistema. Izoliramo jih iz krvi ali kostnega mozga. Lahko se obnavljajo, se diferencirajo v številne specializirane celice, se izplavijo iz kostnega mozga v krvni obtok ali podležejo apoptozi [9].

Številne raziskave so potrdile fenomen imenovan plastičnost (plasticity). Plastičnost omogoča, da matične celice iz enega tkiva omogočijo nastanek vrst celic drugih tkiv. Iz krvotvornih matičnih celic zaradi plastičnosti in pluripotentnosti tako lahko, poleg krvnih in imunskih celic, nastanejo trije glavni tipi možganskih celic (nevroni, oligodendrociti in astrociti), hepatociti, mišične celice ali celice endotelija. Zato je nastalo veliko raziskovalno področje za uporabo somatskih matičnih celic v terapevtske namene [10].



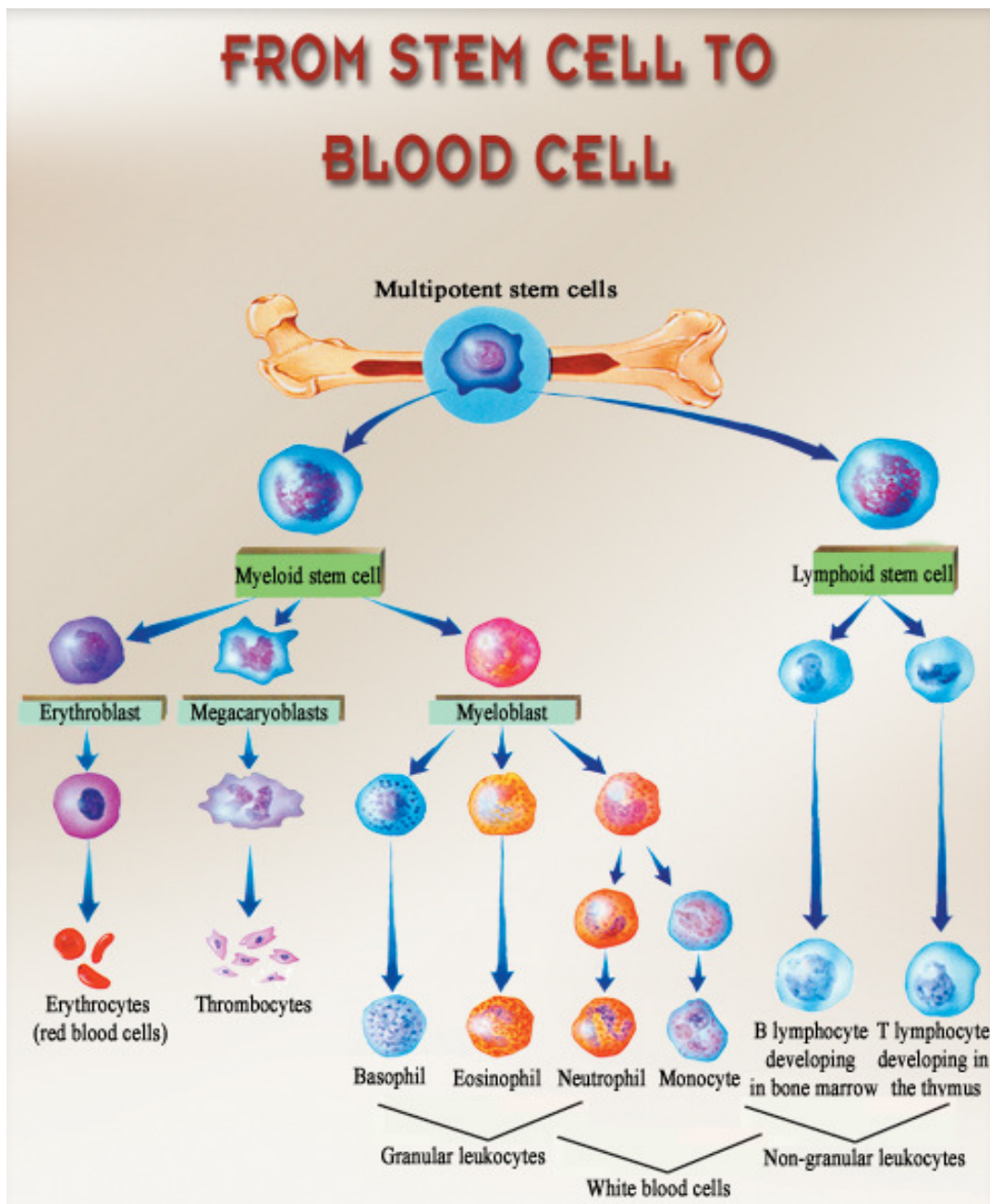
Raziskave so nakazale obstoj dveh tipov krvotvornih matičnih celic. Dolgoročne matične celice (long-term stem cells), ki so sposobne samoobnove ter kratkoročne ali progenične matične celice (short term progenitor cells) iz kostnega mozga, ki lahko takoj obnovijo različne vrste krvnih celic, vendar pa same sebe pod normalnimi pogoji ne morejo obnavljati dolgoročno. To so relativno nedozorele celice, ki so prekurzorji popolnoma diferenciranim celicam enakega tkiva. Imajo sposobnost proliferacije, toda omejeno zmožnost diferenciacije v več kot eno vrsto celic.[9]

### *2.1.1.2 Hemopoeza*

Vse komponente krvi, vključujoč celice imunskega sistema izhajajo iz pluripotentne hematopoetske matične celice iz kostnega mozga, ki se vse življenje obnavljajo in se nahajajo na različnih krajih hemopoeze. Ti kraji se med življenjem oseba spreminjajo. Hemopoeza se najprej začne v rumenjaku vreči, se nato prenese v plodova jetra in končno v kostni mozeg. K razvoju hemopoeze v plodu prispevajo tudi drugi organi, npr. vranica, bezgavke in ledvice. S pomočjo topnih mediatorjev (citokini) in kontaktnih signalov, ki jih oddajajo stromalne celice, lahko te nediferencirane progenične celice povzročijo tvorbo različnih krvnih celic. Te celice so ene redkih telesnih celic, ki so sposobne samoobnove. Prav tako se lahko delijo brez diferenciranja in na ta način tvorijo neomejene zaloge krvnih celic.

Zgodaj v hemopoezi se pluripotentna matična celica diferencira v dve smeri, pri čemer nastaneta ali limfoidna matična celica ali mieloidna matična celica.

Mieloidne matične celice se lahko diferencirajo v megakariocite, iz katerih se tvorijo trombociti; v eritroblaste, iz katerih nastanejo eritrociti; v mieloblaste, iz katerih dobimo nevtrofilce, eozinofilce in bazofilce; v monoblaste, iz katerih nastanejo monociti in dendritične celice. Te celice vstopijo nato v kri.



Slika 2.2: Diferenciacija krvotvornih matičnih celic.[12]

Limfoidne matične celice pa se lahko diferencirajo v izhodiščne ali progenične T-limfocite, iz katerih nastanejo T-limfociti ter v izhodiščne B-limfocite, iz katerih nastanejo B-limfociti. Tu nastanejo tudi celice T ubijalke, vendar potek njihovega nastanka še ni popolnoma pojasnjen, saj izražajo nekatere lastnosti mieloidnih celic.

Vsaka stopnja diferenciacije je povezana z razmnoževanjem, tako da nastane izredno veliko zrelih celic iz majhnega števila matičnih celic. Relativno število različnih celičnih tipov je

uravnavano s hemopoetilnimi rastnimi faktorji in citokini ter z interakcijo s stromalnimi celicami. Med razvojem celice delujejo nanjo mikrookolje, kombinacija in koncentracija različnih rastnih faktorjev, ki določajo pot njene diferenciacije.[10]

### *2.1.1.3 Viri krvotvornih matičnih celic*

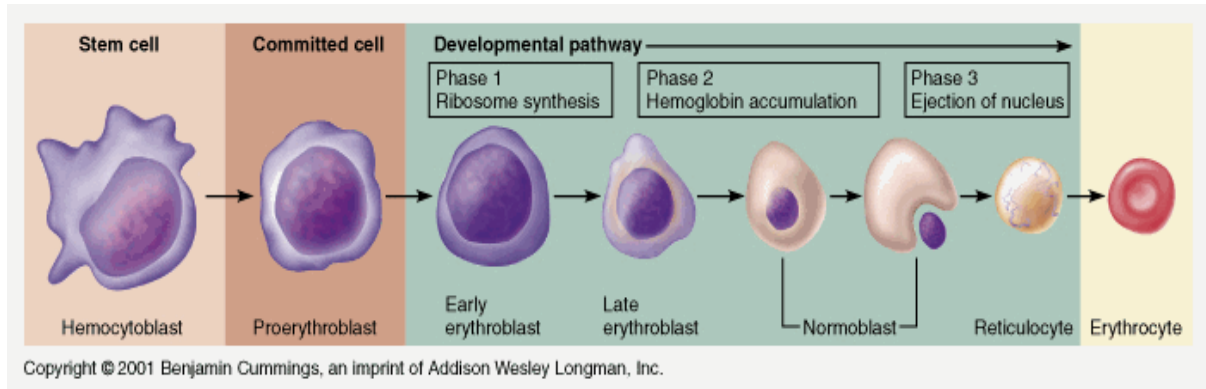
Krvotvorne matične celice se nahajajo v kostnem mozgu, v periferni krvi, v popkovnični in placentarni krvi, v fetalnem krvotvornem sistemu ter v embrijevih zarodnih in matičnih celicah. Vsaka 100 000 celica v kostnem mozgu je dolgoročna krvotvorna matična celica. V krvi je prisotno zelo malo matičnih celic.

### **2.1.2 Rdeče krvne celice**

Rdeče krvničke ali eritrociti so krvne celice, ki oskrbujejo telo s kisikom. Morfološko gledano so sploščene celice, velikosti od 7 do 8  $\mu\text{m}$ , kar je veliko manj od ostalih človeških celic. Joder nimajo, zato je osrednji del upadel in tanjši. Jedra za svoje delovanje ne potrebujejo, zato pa vpliva to na življenjsko dobo, ki je zelo kratka v primerjavi z drugimi celicami (od 100 do 120 dni).

Rdeče krvničke so napolnjene z dihalnim barvilom oz. dihalnim pigmentom hemoglobinom, ki je tudi vzrok rdeče barve eritrocitov. En človeški eritrocit vsebuje okoli 270 milijonov molekul hemoglobina. V krvi odraslega človeka je od 2 do  $3 \times 10^{13}$  eritrocitov, kar je približno  $5 \times 10^6$  krvničk na kubični milimeter krvi.[13]

### 2.1.2.1 Nastajanje eritrocitov - eritropoeza



Slika 2.3: Eritropoeza [14]

Nastajanje rdečih krvničk oz. eritrocitov imenujemo eritropoeza. V resnici gre za dva procesa, ki pa potekata hkrati; to sta proliferacija (delitev) in diferenciacija (dozorevanje).

Eritrociti se v prvi vrsti kot vse druge krvne celice razvijejo iz pluripotentnih matičnih celic (PMC), ki se po enem obdobju razvijejo v multipotentne matične celice mieloične vrste (MMC-M), slednje pa v usmerjene matične celice (UMC) eritroblastne vrste.

Šele iz matičnih celic, usmerjenih v rdečo vrsto (UMC), se lahko prepozna značilne predhodnike, ki jih je morfološko mogoče razlikovati od drugih celic. S skupnim imenom jih imenujemo eritroblasti. Nadaljni razvoj poteka po naslednjih stopnjah:

- pronormoblast,
- bazofilni normoblast,
- polikromatični normoblast,
- ortokromatični normoblast,
- retikulocit,
- eritrocit.

Prva prepoznavna celica rdeče vrste, velikosti približno 25  $\mu\text{m}$ , je pronormoblast. Jedro zavzema skoraj vso celico in vsebuje eno ali več jedrc. Kromatin je enakomerno mrežast. Citoplazma je modre barve, ob robovih je svetlejša.

Bazofilni normoblast je manjši od pronormoblasta, v jedru pa tudi ni več jedrc. Kromatin je gostejši in se združuje v velike grude. Citoplazma je enakomerno modra zaradi velikega števila ribosomov.

Polikromatični normoblast je velikosti od 8 do 15  $\mu\text{m}$ . Citoplazma je vijoličaste barve zaradi večje koncentracije hemoglobina. Jedro je od predhodnika manjše, grude kromatina je manj številne in temnejše barve.

Ortokromatični normoblast (velikost od 7 do 10  $\mu\text{m}$ ) ima majhno, homogeno (enojno) in piknotično (gosto) jedro. Barva citoplazme je podobna eritrocitovi. Ta vrsta celice nima več sposobnosti sinteze DNK in s tem tudi ne nadaljne delitve.

Retikulocit nastane takrat, ko ortokromatični normoblast popolnoma dozori in izloči jedro. Je nekoliko večji od eritrocitov.

Zadnja stopnja razvoja eritrocit in dozori v krvi približno en dan po izhodu iz rdečega kostnega mozga.

Kot vse celice tudi eritrociti nenehno odmirajo, vendar pa za razliko od drugih njihov število določajo fiziološke meje. V normalnih okoliščinah posredno določa te meje količina kisika ( $\text{O}_2$ ) v krvi, ki v primeru njegovega pomanjkanja to zaznajo kemoreceptorji v aortnem loku in pošljejo informacijo o pomanjkanju osrednjemu živčevju, ta pa pošlje ukaze ledvicam za izdelavo tkivnega hormona eritropoetina, ki vzpodbuja rdeči kostni mozeg k izdelavi večjega števila eritrocitov, hkrati pa vpliva na eritroblaste in skrajša čas njihovega dozorevanja. Eritropoetin je po kemični sestavi glikoprotein.

Primer hipoksije zaradi naravnih okoliščin je npr. ta, če se človek zadržuje več časa v visokogorju, kjer je zrak redkejši. Čez čas se število eritrocitov poveča: s tem kri nadomesti manjšo zmožnost prevzemanja kisika iz razdrečenega zraka. Alpinisti in potapljači morajo s sabo pogosto vzeti kisikove bombe za pomoč pri dihanju.[13]

#### *2.1.2.2 Zgradba eritrocitov*

Membrana eritrocita je sestavljena iz:

- dvoslojne lipidne membrane oz. plazmaleme
- integralnih beljakovin
- beljakovinskega ogrodja

Glavne sestavine fosfolipidne membrane so fosfolipidi in neesterificirani holesterol.[2] Fosfolipidi tvorijo dvoslojno membrano tako, da so hidrofilni deli na zunanji in notranji površini, hidrofobni deli pa segajo z obeh strani v notranjost membrane.[3] V zunanjem sloju se nahajata predvsem lecitin in sfingomielin, na notranjem pa fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin.

Transmembranske oz. integralne beljakovine sta glikoforin C in beljakovina 3. S pomočjo teh beljakovin je fosfolipidna membrana pritrjena na beljakovinsko ogrodje. Beljakovina 3 omogoča tudi prenos kloridnih ( $\text{Cl}^-$ ) ter bikarbonatnih ( $\text{HCO}_3^-$ ) anionov: zato je anionski izmenjevalec.

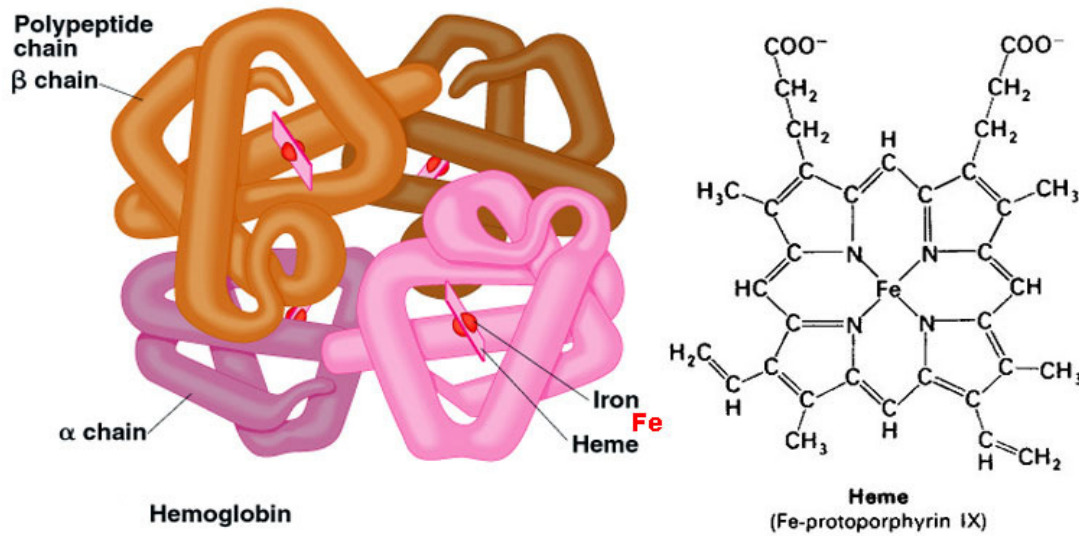
Glavna sestavina beljakovinskega ogrodja je vlaknasta beljakovina spektrin.

Takšna zgradba membrane daje eritrocitu lastnost upogibljivosti in odpornosti proti strižnim silam. Zaradi teh lastnosti lahko spreminja obliko pri prehodu skozi kapilare.[13]

### *2.1.2.3 Delovanje eritrocito*

Na en hemoglobin se v pljučnih mešičkih oz. alveolah vežejo 4 molekule kisika (vežejo se na hem oz. železov atom) in nastane oksihemoglobin. Eritrociti vsebujejo tudi encim karboanhidrazo, ki katalizira nastajanje in razpad ogljikove kisline ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), in s tem sodelujejo posredno tudi pri transportu ogljikovega dioksida iz tkiv.

Na hem se zelo dobro veže tudi ogljikov monoksid (CO), kar lahko povzroči notranjo zadušitev, to pomeni, da telo ne prejema kisika: posledica tega je nezavest, ob prepočasni pomoči pa tudi smrt.[13]



Slika 2.4: Slika hemoglobina in hema [15]

- **Zgradba hemoglobina**

En del hemoglobina sestavljajo štiri zavite polipeptidne verige, ki jih skupno imenujemo globin. Vsaka polipeptidna veriga obdaja v sredini nebeljakovinski del molekule, imenovane hem. Hem je sestavljen iz štirih pirolovih obročev in železa. Na železove atome, ki so vgrajeni v heme hemoglobinskih molekul se veže kisik. En hem lahko veže nase eno molekulo kisika, torej lahko ena molekula hemoglobina veže štiri molekule kisika. Ker je železo nujno za vezavo kisika na hemoglobin sta za tvorbo in dozorevanje rdečih krvničk nujno potrebna zadostna količina železa in beljakovin. Hemoglobin se sintetizira v več korakih. Hem (feroprotoporfirin IX) se tvori v mitohondrijih in citosolu že ne dozorelih rdečih krvničk, globin pa se tvorijo ribosomi v citosolu. Sinteza hemoglobina se nato nadaljuje v krvnih celicah med zorenjem v rdečem krvnem mozgu.

- **Snovi potrebne za nastanek eritrocitov**

Pomembne snovi za nastanek eritrocitov so železo, vitamin B<sub>12</sub> in folna kislina v manjših količinah tudi vitamin C, riboflavin in baker. Pri sintezi rdečih krvnih celic igra pomembno vlogo hormon eritropoetin, ki nastaja v ledvicah. [16]

#### ❖ *Železo*

Je sestavina vseh celic. Železo se v organizmu nahaja kot aktivno železo (encimi in Hb) in kot rezervno v raznih tkivih. Rezervno železo ima vlogo pri nastajanju novih eritrocitov in encimov takrat kadar obstaja povečana potreba po eritrocitih in encimih. Celokupna količina železa v organizmu osebe teže 70 kg je med 3 in 5 g. Največja količina železa se nahaja v Hb eritrocita (približno 2g). Rezervnega železa je nekje 1g, preostali del železa pa se nahaja v encimih, mioglobinu in v krvni plazmi. Železo v krvni plazmi je vezano na beljakovino transferin. V krvni plazmi vrednost železa variira med 10,5 in 28  $\mu\text{mol/l}$ . Pri ženskah so te vrednosti nekoliko nižje. [17]

#### ❖ *Vitamin B<sub>12</sub>*

Poznamo ga tudi pod imenom kobalamin. Kobalamin nastaja v človeškem organizmu s pomočjo določenih bakterij in glivic. Kobalamin pridobimo preko hrane v človeški organizem (meso, drobovina, sir, mleko). V mešani hrani, ki vsebuje dosti mesa se nahaja kobalamin

nekje v vrednosti 30  $\mu\text{g}$ . Vitamin B<sub>12</sub> oz. kobalamin se veže na določene beljakovine, transkobalamine najpogosteje v jetrih in ledvicah. Iz jeter se kobalamin prenaša v kostni mozeg v katerem je kobalamin potreben za nastajanje vseh krvnih celic. Vrednost vitamina B<sub>12</sub> v človeškem organizmu variira med 2 in 5 mg. [17]

#### ❖ *Folna kislina*

Nahaja se v obliki njenih soli folato in sicer v naravi. Folate najdemo v sadju, zelenjavi, drobovini, jajčnem rumenjaku, kvasu in v gobah. Dnevne potrebe folatov znašajo nekje 50  $\mu\text{g}$ . Folati se v hrani nahajajo v obliki večjih molekul to je poliglutanatov, ki pa se morajo razgraditi v male molekule monoglutamate, da bi se lahko vpili v tanko črevo. Vitamin B<sub>12</sub> in folna kislina imata v organizmu skupno vlogo in sicer omogočata v jedru celice sintezo DNK v kateri se nahajajo geni. V tem skupnem delovanju kobalamin pretvarja folno kislino v njeno aktivno obliko katera omogoča sintezo DNK iz njenih kemijskih predhodnikov. Če primanjkuje folna kislina ali kobalamin se pojavi anemija. [17]



#### ❖ *Eritropoetin*

Povzroči v krvnem mozgu delitev usmerjenih matičnih celic rdeče vrste in njihovo dozorevanje v eritroblaste in hkrati skrajša njihov čas dozorevanja. Posledično se poveča tvorba eritrocitov in tako poveča izplavljanje mlajših manj zrelih retikulocitov v krvi.[17]

#### *2.1.2.4 Razgradnja eritrocitov*

Normalna življenska doba eritrocitov v krvi je 100 do 120 dni. Ko ostarijo, jih fagocitirajo makrofagi retikulo-endotelijskega sistema. Glavno vlogo pri razgradnji ostarelih eritrocitov ima vranica. S staranjem eritrocitov se zmanjša aktivnost številnih encimov, ki vzdržujejo njihovo zgradbo in funkcije. Zato se zmanjša upogljivost eritrocitne membrane in poveča krhkost eritrocitov, zmanjša se površinski naboj membrane in poveča količina methemoglobina v eritrocitu. Methemoglobin je neaktivni hemoglobin v katerem se dvovalentno železo oksidira v tro-valentno ta pa več ne prenaša kisika.[17]

## 2.2 Fiziološka vloga železa v človeškem telesu

Ker železo obstaja v dveh ionskih oblikah  $Fe^{3+}$  in  $Fe^{2+}$  je lahko kofaktor encimov v oksidacijsko-redukcijskih reakcijah. V vsaki celici železo sodeluje s proteini (citohromi, citohrom oksidaze, peroksidaze, katalaze) v verigi prenosa elektronov v procesu pridobivanja energije. Ti proteini prenašajo atome vodika in elektrone iz energetskih makronutrientov na kisik pri čemer nastaja ATP, katerega celica izkorišča za potrebe svojega metabolizma, in voda. Prav tako je komponenta encimov v glukoneogenezi, encimov, ki so vključeni v sintezo aminokislin, hormonov in nevrotransmiterjev. Železo ima vlogo v razvoju možganov, je esencialno za sintezo nevrotransmiterjev, in delovanju imunskega sistema.[18] Železo je soudeleženo pri prenašanju kisika iz pljuč v tkiva. V hemoglobinu se reverzibilno veže s kisikom in ga prenaša iz pljuč do celic ter odnaša  $CO_2$  iz celic v pljuča.

### **2.2.1 Vloga železa v eritropoezi**

Ker je sposobnost prenašanja kisika po telesu odvisna od vsebnosti hemoglobina v eritrocitih ima železo najpomembnejšo vlogo pri nastajanju eritrocitov v eritropoezi oziroma pri sintezi hemoglobina (Hb). Hb predstavlja pri človeku največji oddelek z železom 70% celotnega železa. 1ml koncentriranih eritrocitov vsebuje okoli 1mg Fe. Vsaka podenota Hb ima po eno hemovo skupino. Hem je sestavljen iz pirolonih obročev. Štirje obroči so povezani v večjo strukturo, Fe pa se nahaja v sredini.

Vsak dan se sintetizira 300mg hema, ki se ga večina porabi za sintezo Hb, ostali pa postane del mišičnega mioglobina. Pomen Hb je prenos kisika. Hemoglobin ali rdeči pigment predstavlja 25-35 % rdeče krvne celice. Železo mu daje značilno rdečo barvo. Večja kot je njegova koncentracija v rdeči krvnički, več bo lahko vezala nase kisika in ga prenesla v posamezna tkiva. Skoraj 100 % kisika, ki ga kri prenaša po telesu, je vezanega nanj. V kostnem mozgu vsak dan dozori 2-3 milijone eritrocitov na sekundo. Vsakodnevno se mora sintetizirati 6g Hb, za kar mora imeti kostni mozeg na razpolago 30-40 mg Fe. Ker je ta količina dvajsetkrat večja od količine Fe, ki se dnevno absorbira iz prebavil ali je na razpolago v krvnem obtoku je organizem razvil dodatne mehanizme pridobivanja Fe iz fagocitiranih starih eritrocitov. V eritroblastu se Fe v mitohondriju vgradi v hem ali pa se veže kot feritin v sideroblastih. V mitohondriju ga encim hem sintetaza vgradi v hem. [19]

### **2.2.2 Kroženje železa v človeškem telesu**

Železo kroži v skoraj zaprtem krogu. Iz krvne plazme potuje v krvni mozeg do eritroblasta, kjer se vgradi v Hb. V tej obliki kroži štiri mesece po krvi. Ko eritrociti ostarijo jih fagocitirajo makrofagi v kostnem mozgu, jetrih in vranici. Iz sproščenega hemoglobina se izloča železo, ki se ponovno uporabi za sintezo hemoglobina in njegovo kroženje se ponavlja. [20] V plazmi je večina železa vezanega na prenašalni protein transferin. Transferin je protein, ki nastaja v jetrih. Lahko veže dva  $Fe^{3+}$  iona ( $Fe^{2+}$  ne more) v nevtralni ali slabo alkalni raztopini. Sposobnost transferina, da veže in sprošča železove ione je odvisna od pH raztopine. Pri normalnih pogojih je nasičenega transferina v telesu le 33%. Med transferinom in proteini, ki lahko vežejo ione se neprestano odvija borba za proste železove ione. Približno 1/3 transferina veže železo (Fe/S), a 2/3 so proste, tj. transferin je v plazmi prost

(UIBC=unsaturated iron binding capacity; IBC=iron binding capacity). Celotni transferin (TIBC=total iron binding capacity) je vsota železa vezanega na transferin (Fe/S) in vrednost transferina brez železa (UIBC, oziroma IBC). Transferin predstavlja približno 3% vseh plazemskih proteinov.[21]

### **2.2.3 Sprostitev železa iz ostarelih eritrocitov**

Razpad ostarelih eritrocitov in razgradnja Hb se vrši v celicah monocitno- makrofagnega sistema. (kostnega mozga, jeter in vranice). Pri prebavi fagocitiranih eritrocitov se sprostijo v nekaj urah do 20% železa od katerega se ga 80% ponovno vgradi v Hb. Tako se v 12 dneh 40% sproščenega železa iz odmrlih celic ponovno vgradi v eritrocite.

Sproščeni hemoglobin se v makrofagih razgradi v globin in hem. Aminokisliline, ki se pri proteolizi hemoglobina sprostijo, se porabijo za sintezo drugih beljakovin. Protoporfinski obroč se najprej odpre in nato reducira v bilirubin. Bilirubin iz makrofagov prehaja v kri, kjer se veže na serumski albumin. V jetrih prehaja iz plazme v jetrne celice, kjer se konjugira predvsem z glukuronsko kislino in postane vodotopen. Slednjega jetrne celice izločijo v žolč.[17]

### **2.2.4 Zaloge železa v telesu**

Višek železa v telesu se shrani kot feritin ali hemosiderin v celicah kostnega mozga, vranice ali jeter. Feritin je globularna beljakovina, sestavljena iz 24 podenot, ki predstavlja v evkariontskih in prokariontskih organizmih poglavitno skladiščno mesto za železo. Železovi ioni so v kompleksu s feritinom v topni in netoksični obliki. V sredini beljakovinskega kompleksa se skladišči železo v obliki hidroksidnih in fosfatnih kristalov. Ena molekula feritina lahko vsebuje okoli 4500 železovih ionov v feri-obliki ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Kadar je feritin prost, brez vezanega železa, govorimo o apoferitinu.

Apoferitin je sestavljen iz 24 beljakovinskih podenot, ki so razporejene v 12 dimer in jih sestavljajo lahke (L) ali težke (H) monomere z različnimi lastnostmi. V celici razmerje obeh vrst monomer ni enako. L monomere vsebujejo hidrofilne ostanke, ki zadržujejo in vežejo Fe in so zato odgovorne za rast kristala železovega hidroksida. H monomere imajo manj teh ostankov, sodelujejo pri nastajanju por, skozi katere prehaja železo v in iz celice in imajo aktivnost encima feroksidaze, ki omogoča, da apoferitin hitro sprosti ali sprejme Fe.

Če vsebuje feritin več H monomer hitreje prejme Fe, ga pa ne zadrži tako trdno kot feritin z več L monomerami.

V celicah se železo tako skladišči v obliki feritina in tudi hemosiderina. Slednji nastane z agregiranjem feritinskih molekul in je v vodi netopen. Železo se iz feritina in hemosiderina v primeru potreb organizma zopet sprošča; lažje se sprost iz feritina kot iz hemosiderina. Sprostitev železa iz zalog poteka preko redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ , ki se sprost iz kristala in prehaja skozi apoferitinsko ovojnico. Ko potuje iz citosola v plazmo, se ponovno reoksidira ter se v plazmi veže na transferin. Kadar se potreba po železu poveča, feritin razpade in sprost se železo. Serumska koncentracija feritina kolerira s količino telesnih zalog železa in je zato pogost pokazatelj zalog železa v organizmu v laboratorijskem testiranju. Za osebo moškega spola je normalna koncentracija feritina od 12-300 ng/mL, za osebo ženskega spola pa od 12-150 ng/mL. Nižja kot je koncentracija feritina v telesu, večja je verjetnost, da osebi primanjkuje železa. Največ feritina je v ledvicah, vranici in kostnem mozgu. [22]

### **2.2.5 Prehod železa v celico**

Na transferin vezano železo prihaja v celice preko transferinskega receptorja (TR). TR imajo ključno vlogo v uravnavanju oskrbe celic z železom. Največja koncentracija TR je v membranah nezrelih eritrocitov, v hitro delečih se celicah in v posteljici. TR je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, povezanih z disulfidnimi vezmi. Molekulska masa vsake podenote je 95.000 daltonov. Ima dva pola. Na citoplazemskem polu ima dve hidrofilni mesti, na notranji strani membrane pa hidrofobni pol, ki omogoča vključitev receptorja v membrano. TR ima veliko afiniteto do diferičnega transferina. Zato je prenos železa v celico mogoč tudi tedaj, ko je koncentracija na transferin vezanega železa zelo nizka. Po vezanju na receptor sledi neke vrste endocitoza (endosom ali receptosom). Endosom se v celici združi z veziklom s pH, manjšim od 5,5. Kislo okolje omogoči sproščanje železa iz transferina. V celici se železo vključi v biokemične procese, presežek pa se skladišči v obliki feritina. Transferin se v kislem okolju veže z apotransferinom in se preko receptorja vrne v citoplazmo. Kadar celice potrebujejo veliko železa, pomnožijo TR, če pa so z železom preobremenjene, je na membranah in posledično tudi v citoplazmi minimalno število receptorjev. [23]

### 2.2.6 Viri železa v živilih

Železo se v hrani nahaja dveh oblikah:

- Hem železo, katerega vir sta hemoglobin in mioglobin v živilih živalskega izvora. Hem železo običajno predstavlja le 10% do 15% vsega železa v prehrani in kar tretjino vsega absorbiranega železa.
- Nehem železo se nahaja v hrani rastlinskega in živalskega izvora, ima pa bistveno nižjo biološko vrednost kot hem železo, na njegovo absorpcijo pa znatno vplivajo druge snovi v prehrani. Absorpcijo izboljšujejo vitamin C, razne organske kisline in živalske oz. mesne beljakovine, zavirajo pa inozitol-heksafosfat, ki se nahaja v stročnicah in žitaricah (že majhne količine lahko absorpcijo zmanjšajo za 50%), polifenoli, ki se nahajajo v sadju, zelenjavi, vinu, čaju in kavi, sojine beljakovine (neodvisno od inozitol-heksafosfata) ter dodatki kalcija.[20]

Veliko ga je v temnem mesu, jetrih, ribah, ostrigah, racah, kjer je v helatni, hem obliki, ki se lažje absorbira iz prebavil v kri. Železo v nehemski obliki je v rumenjaku, temno zeleni listnati zelenjavi, oreščkih, neoluščenih žitih in suhem sadju (rozine, marelice, datlji, slive). V mleku in zelenjavi je železa malo.

#### ❖ *Hranila, ki vsebujejo veliko železa*

- *sadje*: rozine, suho sadje (marelice, datlji, slive), jagode, borovnice, ribez, brusnice, aronija, hruške, banane, češnje,
- *zelenjava*: brokoli, špinača, beluši, buče, žito, paradižnikov sok, pšenični kalčki, gorčica, blitva, ohrovt, regrat, fižol,
- *meso*: jetra, vse vrste temnega mesa, perutnina, školjke, ribe.

Preglednica 3.1: Vsebnost železa v živilih [20]

živilo	železo(mg / 100g)
leča	11,1
školjke	10,90
goveja jetra, kuhana	7,80
sezamovo seme	10,4
sojino zrnje	9,7
piščančja jetra	9,2
rdeč fižol	6,4
ostrige, surove	5,01
govedina na žaru	4,25
mandlji	4,0
suhe marelice	3,2
jajce	2,0
piščančje prsi, kuhane	1,90
tofu	1,2
losos	1,2
brokoli	1,0

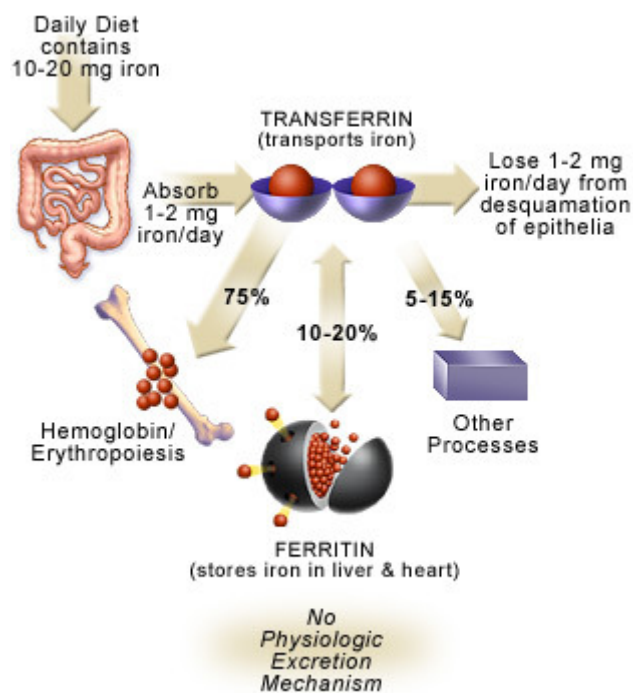
Kuhanje v železni posodi lahko poveča količino železa v hrani..[20]

### 2.2.7 Absorbpcija železa iz hrane

V hrani je dnevno 10-20 mg železa. Pri zdravem človeku se absorbira 10% vsega železa, pretežno v dvanajstniku in jejunumu. Železo se absorbira predvsem v dvanajstniku, vendar le 2+ oblika. V tem delu črevesja je pH med 5 in 7. V takšnem okolju tvori trovalentno železo ( $Fe^{3+}$ ) slabo topne hidrokside, ki se skoraj ne absorbirajo. V nasprotju s trovalentnim železom pa se dvovalentno železo, zlasti organsko vezano (hem), zelo dobro resorbira iz prebavil.

Vitamin C še izboljša absorpcijo železa v kri, saj preprečuje oksidacijo železa iz dvovalentne oblike v slabše uporabno trovalentno obliko. Ker v hrani prevladuje 3+ oblika, se mora železo v želodcu reducirati. Absorpcija je slabša, če želodčni sok ni dovolj kisel.[20]V soku se nahajajo majhne molekule aminokislin in keto sladkorjev, ki stabilizirajo trovalentno Fe( $Fe^{3+}$ ). Transmembranski encim železova reduktaza pretvori  $Fe^{3+}$  v  $Fe^{2+}$ , ki ga prenese divalentni prenašalni protein 1 (divalent metal transporter protein1-DMTI) v notranjost celice.[17]

Pri pomanjkanju železa je absorbcija večja: 15-20%. Telo dobi 60% železa v mesu v obliki hema, 40% pa iz zelenjave, sadja in žit, v nehemski obliki. Na absorpcijo nehemskega železa vplivajo različni dejavniki, ki jo lahko spremenijo do desetkrat. Odstotek absorbiranega železa iz hrane se pri povečani količini zmanjša. [20]



Slika 2.5: Absorbcija železa iz hrane [26]

### 2.2.7.1 Snovi, ki vplivajo na absorbcijo železa

#### 1. Dejavniki, ki znižujejo absorpcijo železa

- *Fitati*

To so soli inozitol heksafosfata v otrobih, moki, sadju, grozdju, oreščkih, v žitnih zrnih in zelenjavi. 90% jih je v žitnih jedeh. Vežejo železo in onemogočajo njegovo absorpcijo. Njegovo absorpcijo zavirajo tudi fosfati.

➤ *Fenolne spojine*

Rastline vsebujejo fenolne spojine, ki jih varujejo pred insekti, živalmi in človekom. Galolilna skupina nekaterih fenolnih spojin zavira absorpcijo železa. Hrana, ki vsebuje polifenole: čaj, kava, kakav, zelenjava (špinača) in začimbe (origano), zmanjša absorpcijo železa.

➤ *Kalcij*

Kalcijeve soli in mlečni izdelki (mleko, jogurt, skuta, sir) zavirajo absorpcijo železa. Kozarec mleka zniža absorpcijo železa za polovico.

➤ *Proteini soje*

Sojini pripravki vsebujejo fitate, ki znižujejo količino absorbiranega železa.

## 2. Dejavniki, ki povečujejo absorpcijo železa

➤ *Askorbinska kislina*

Vitamin C povečuje absorpcijo nehemskega železa, saj kot antioksidant reducira železo iz tri-(feri) v dvovalentno (fero) obliko, ki se lahko absorbira.

➤ *Meso, ribe in morski sadeži*

Vsa ta živila pospešujejo in povečujejo absorpcijo železa v hemske in v nehemske oblike.

➤ *Organske kisline*

Citronska, jantarna, mlečna kislina, ipd. povečujejo absorpcijo nehemskega železa. Tudi kislo zelje jo povečuje.[20]

### 2.2.7.2 Potek absorpcije:

- Po vstopu v krvni obtok se Fe takoj veže na transferin (serumski protein z dvema mesti za Fe);



- Tako nastane kompleks, ki potuje do ciljnih celic, kamor vstopi po vezavi transferina na transferinski receptor (transferin, ki nima vezanega Fe imenujemo apotransferin – monomerni glikoprotein, ki spada med  $\beta$ -globuline);
- Glavno mesto sinteze so jetra, sinteza pa je odvisna od potreb po Fe. Pri pomanjkanju se sinteza transferina poveča in obratno;
- Ko je kompleks vezan na receptor, se s pomočjo endocitoze pomakne v notranjost celice, kjer zaradi nizkega pH pride do sprostitve Fe, ki se v celici vgradi ali pa se skladišči;
- Nastali apotransferin receptor se vrne nazaj na površino celice, kjer pride do odcepitev apotransferina iz receptorja, ki ponovno preide v kri;
- Skladiščenje Fe poteka z vezavo Fe na feritin, v določenih primerih pa se lahko skladišči vezan na hemosiderin.[24]

### *2.2.7.3 Regulacija absorpcije železa*

Absorpcijo Fe regulirajo najverjetneje trije regulatorni mehanizmi in tako vzdržujejo normalno vsebnost železa v telesu.

- Dietni regulator deluje na podlagi visoke intracelularne koncentracije Fe, zaradi česa se zmanjša izražena DMT1 (divalentni prenašalni protein 1, divalent metal transporter protein 1-DMT1). Regulator zalog kontrolira absorpcijo Fe glede na njegove zaloge .
- Eritropoetinski regulator regulira absorpcijo glede na potrebe eritropoeze .
- Peptidni hormon hepcidin, ki se sintetizira v jetrih, bi naj po zadnjih ugotovitvah direktno deloval na presnovo železa. Majhno izločanje hepcidina vodi do intracelične preobremenitve s Fe, veliko izločanje pa do pomanjkanja. Hepcidin regulira tudi
- izločanje Fe z vezavo na protein ferroportin (IREG) na celični površini tako, da celica ne more izničiti Fe , kar vodi do zmanjšane koncentracije izvenceličnega Fe.[25]

### **2.2.8 Izločanje železa**

Izločanje železa iz telesa ni regulirano. Moški in ženske po rodni dobi izgubljajo dnevno 1 mg železa z odluščenimi celicami kože, prebavil, s sečem in znojem. Ženska izgubi z menstruacijo še 30-40 ml krvi, z njo pa 15-20 mg železa. To pomeni dodatnih 0,5 mg železa na dan. Z nosečnostjo in porodom dodatno izgubi 500 mg železa.

### **2.2.9 Pomanjkanje železa**

Pomanjkanje železa je najbolj razširjeno pomanjkanje hranilne snovi na svetu. Na splošno ločimo tri stopnje pomanjkanja železa :

1. izčrpane so zaloge, vendar funkcionalnega pomanjkanja še ni;
2. zgodnje funkcionalno pomanjkanje železa že moti nastajanje rdečih krvnih celic;
3. daljše pomanjkanje železa pozroči mikrocitno hipokromno slabokrvnost – anemijo, za katero so značilne majhne rdeče krvne celice z nizko vsebnostjo hemoglobina. Simptomi (bledica, utrujenost, slabost) so posledica nezadostne oskrbe s kisikom in moten potek vseh telesnih procesov, v katerih sodelujejo snovi, ki vsebujejo železo. Anemija zaradi pomanjkanja železa se zdravi z železovimi dodatki.[27]

Vzroki za pomanjkanje so lahko:

- hitra rast; pomanjkanje zaradi hitre rasti se lahko pojavi pri dojnčkih, otrocih starih od 6 mesecev do 4 let in adolescentih v obdobju hitre rasti;
- nosečnost; potrebe po železu so povečane zaradi oskrbe zarodka in posteljice ter povečanja volumna krvi;
- kronična krvavitev v primeru nekaterih bolezni;
- akutna krvavitev, ki pa običajno povzroči le kratkotrajno pomanjkanje, saj se izčrpajo le zaloge železa;
- bolezni, ki povzročajo slabšo absorpcijo železa v črevesju (celiakija, infekcija);

- vegetarijanstvo; ker je biološka razpoložljivost železa iz rastlinskih virov precej manjša kot biološka razpoložljivost iz živalskih virov, morajo vegetarijanci zaužiti približno 80% več železa in paziti, da zaužijejo tudi dovolj snovi, ki optimizirajo absorpcijo železa;
- redna in intenzivna telesna vadba; potrebe telesno aktivnih ljudi so lahko do 30% višje kot pri nekativni populaciji.[27]

#### *2.2.9.1 Absolutno in funkcionalno pomanjkanje železa*

O absolutnem pomanjkanju železa govorimo takrat, kadar so zaloge v telesu zmanjšane ali popolnoma izčrpane, kar ocenimo s koncentracijo serumskega feritina in nasičenostjo transferina. Pri posebnih bolezenskih stanjih, kot je kronična ledvična odpoved na nadomestnem zdravljenju s hemodializo, so želene vrednosti zalog železa drugačne. Kadar je potreba po oskrbi z železom povečana zaradi povečane sinteze hemoglobina in retikuloendotelni sistem ni sposoben sprostiti tolikšne količine železa kljub zadostnim ali celo povečanim zalogam, govorimo o funkcionalnem pomanjkanju železa. To stanje je lahko posledica zdravljenja z r-HuEPO (humani rekombinantni eritropoetin), ki močno pospeši eritropoezo, lahko pa je posledica omejenega sproščanja železa iz zalog zaradi vnetja, npr. pri anemiji ob kroničnih boleznih.[28]

#### **2.2.10 Preobremenitev z železom**

Preobremenitev z železom je posledica dveh vzrokov. Kadar se koncentracija plazemskega železa tako poveča, da ga transferin ne more vsega vezati, absorbirajo preostalo Fe parenhimske celice jeter, kasneje pa se Fe nabira še v srcu, trebušni slinavki in drugih organih. Drugi vzrok je kopičenje Fe zaradi povečane razgradnje eritrocitov na primer pri pogostih transfuzijah eritrocitov. Vsaka podenota transfundirane krvi vsebuje 200 do 250 mg Fe. Za bolnike, ki morajo pogosto prejemati transfuzije pomeni to dnevni dvig Fe do 0.5 mg/kg telesne teže. Na ta način se pri bolnikih pokažejo znaki preobremenitve z železom že po 10 do 20 transfuzijah. Železo iz razpadlih eritrocitov se najprej nabira v makrofagih in šele kasneje v parenhimskih celicah in drugih organih s posledično okvaro organov. [17]

## 2.3 Anemije

Anemija ali slabokrvnost je bolezensko stanje, kjer je zmanjšana celotna količina hemoglobina, kar je posledica bodisi primanjkljaja eritrocitov bodisi manjše količine hemoglobina v eritrocitih. Zaradi zmanjšane količine hemoglobina (Hb) se zmanjša sposobnost krvi, da prenaša kisik po krvnem obtoku do posameznih tkiv, ki ga nujno potrebujejo za normalno delovanje.[1]

### 2.3.1. Vzroki za nastanek anemij

- slaba absorpcija ali pomanjkanje železa, vitamina B12 ali folne kisline v naši prehrani snovi, ki jih potrebujemo za tvorbo eritroblastov.
- izguba krvi, npr. med menstruacijo, zaradi operacije ali krvavečih razjed na želodcu
- bolezni kostnega mozga
- rak
- kemoterapije, ...

#### 2.3.1.1 Prilagoditve telesa na zmanjšano sposobnost krvi, da prenaša kisik

- poveča se koncentracija 2,3 difosfoglicerata v eritrocitih. Ta se veže s hemoglobinom in zmanjša njegovo afiniteto do kisika, kisik pa se tako lažje in v večji meri sprošča v tkivih;
- prerazporeditev krvi v organe, ki potrebujejo več kisika;
- prilagoditev krvnega pretoka. Poveča se minutni srčni volumen, zaradi večjega iztisnega volumna in manj zaradi hitrejšega srčnega utripa. Krvni obtok se pospeši, upor v perifernem ožilju se zmanjša.[17]

#### 2.3.1.2 Najpogostejši znaki in simptomi anemije

- bledica kože in sluznic;
- utrujenost, šibkost, zaspanost, vrtoglavica, glavobol, slaba koncentracija;
- srčne težave (povečan je srčni minutni volumen (SMV)-zadihanost, stenokardične; težave-angina pectoris, razširjene so srčne votline, srčna mišica hipertrofira, v končni fazi pa lahko pride do odpovedi srca zaradi ishemične okvare srca;
- zmanjša se viskoznost krvi (zmanjša se periferni upor, zato se poveča SMV);
- pikčaste in večje kožne krvavitve (posledica zmanjšane števila trombocitov).



### **2.3.2 Razvrstitev anemij**

❖ *Po koncentraciji Hb-a lahko anemijo opredelimo v naslednje stopnje:*

1. blaga anemija (do 90 g/l Hb)
2. srednje huda anemija (90-70 g/l Hb)
3. huda anemija (70 -30 g/l Hb)
4. zelo huda anemija (pod 30 g/l Hb)

Anemije razvrstimo po vzrokih oz. nastanku (patogenska razvrstitev) ali po absolutni vrednostih eritrocitov (morfološka razvrstitev).

❖ *Glede na nastanek razlikujemo :*

- anemijo zaradi krvavitve
- anemijo zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov ali Hb-na
- anemijo zaradi hitrejšega razpada eritrocitov

❖ *Glede na povprečni volumen eritrocitov (PVE) jih razdelimo :*

- mikrocitne (zaradi pomanjkanja železa, sideroblastne, talasemije minor)
- makrocitne (megaloblastne, nemagaloblastne makrocitne)
- normocitne (hemolitične, anemije pri kroničnih boleznih, aplastične....)

### **2.3.3. Mikrocitne anemije**

O mikrocitni anemiji govorimo takrat, ko je povprečni volumen eritrocitov (PVE) v krvi manjši od 77 fL, kadar je znižana povprečna količina hemoglobina, medtem ko se povprečna koncentracija Hb v eritrocitih znižana le pri hudih anemijah. Normalno se eritroblasti delijo štirikrat. Če pa je sinteza Hb okrnjena, se število delitev poveča, z vsako delitvijo pa se zmanjša velikost eritroblastov. Tako nastanejo eritrociti, ki so manjši kot normalno in vsebujejo manj hemoglobina – razvoj hipohromnih eritrocitov.

❖ *Vzrok pomanjkljive sinteze Hb in s tem mikrocitne hipohromne anemije so lahko:*

- pomanjkanje železa (sideropenična anemija);

- motnje v vključitvi atoma železa v molekulo hema (sideroplastne);
- nezadostna sinteza polipeptidnih verig-globina (talasemije);
- motena sinteza hema (lahko so tudi normocitne);

Pri nas je najbolj pogosta vrsta mikrocitne, hipohromne anemije sideropenična anemija.[1]

### **2.3.4 Makrocitne anemije**

Pri makrocitnih anemijah je PVE večji od 100 fL. Delitve eritroblastov so manj številne in trajajo dlje. Dozorevanje jedra zaostaja za citoplazmo. Pri tem sinteza Hb ni okrnjena. Eritroblasti so povečani in jih zato imenujemo megaloplasti. Megaloplasti deloma odmrejo preden dozori - neučinkovita eritropoeza. Če dozori, nastajajo večji eritrociti, ki vsebujejo tudi več Hb in hitreje odmrejo. Razvije se anemija, ki jo zaradi velikih eritroblastov v kostnem mozgu imenujemo megaloplastna.[1]

#### *2.3.4.1 Megaloplastna anemija*

Sodi med pogoste vrste anemij. V čisti obliki je vedno makrocitna. Imenujemo jo po značilnostih velikih eritrocitih v kostnem mozgu. Vzrok zanjo je pomanjkanje folatov, vitamina B12 ali obeh hkrati in zdravil, ki ovirajo sintezo DNA, dednih nepravilnosti. Pojavlja se v vseh starostnih obdobjih in pri obeh spolih enako. Razvoj megaloplastne anemije in spremembe v krvni sliki in kostnem mozgu so enaki, ne glede na to ali gre za pomanjkanje folatov ali vitamina B12. Oba vitamina sta namreč sodelujoča pri sintezi DNA. Upočasnijo in zmanjšajo sintezo DNA. Prizadete so predvsem celice, ki se hitreje in bolj obnavljajo. Sem sodijo tudi nezrele krvne celice v kostnem mozgu. Med temi je najbolj prizadeta rdeča celična vrsta (eritroblasti).

Zaradi nezadostne sinteze DNA se eritroblasti deloma kopičijo v premitotičnem obdobju celičnega kroga obnavljanja. Med njimi so številni, ki se več ne delijo in odmrejo. Kljub temu, da se celice rdeče vrste razraščajo, kostni mozeg zaradi prevelikega odmiranja megaloplastov ne more v celoti nadomestiti eritrocitov, ki se prezgodaj izločijo iz krvnega obtoka. Posledica je anemija.[1]

❖ *Spremembe v rdečem kostnem mozgu in krvi pri makrocitnih megaloplastnih anemijah*

Pri bolnikih z megaloplastno anemijo so v kostnem mozgu vidne mnoge spremembe. V njem najdemo povečano število celic (hipercelularnost), opazno pa je zmanjšanje razmerja med mieloidnimi in eritroidnimi prekursorji. Prekursorji eritropoeze so nenormalno veliki, imajo jedro, ki pa je nezadostno razvito. Jedrni kromatin je preveč razpršen. Ko se kondenzira, nastane jasna oblika, značilna za megaloplastno anemijo. Vidijo se tudi nenormalne mitoze.

### **2.3.5 Normocitne anemije**

Pri normocitnih anemijah je PVE (povprečni volumen eritrocitov) v normalnem območju (od 80 do 95 fL), prav tako tudi velikost eritrocitov in vsebnost hemoglobina. Glede na število retikulocitov delimo normocitne anemije na tiste, pri katerih je zmanjšano ali normalno število retikulocitov (anemija pri kroničnih boleznih, aplastična anemija). Pri povečanem številu retikulocitov pa ločimo anemije po akutni krvavitvi in hemolitične anemije.[1]

#### *2.3.5.1. Hemolitične anemije*

Nastanejo zaradi povečanega razpada eritrocitov (hemolize). Zaradi hemolize je lahko tvorba eritrocitov petkratno do sedemkratno povečana. Kadar povečana eritropoeza nadomesti povečani razpad eritrocitov, anemije ni. Govorimo o kompenzirani anemiji. Anemija nastopi takrat, ko povečana eritropoeza ne dohaja več povečanega razpada eritrocitov. Glede na mesto razpada razlikujemo intravaskularno (eritrociti razpadejo v krvnem obtoku, hemoglobin se sprosti v plazmo) in ekstravaskularno (eritrociti razpadejo v retikuloendotelijskem sistemu, predvsem v vranici) hemolizo. Glede na vzrok za hemolizo ločimo korpuskularne hemolitične anemije (vzrok za hemolizo je posledica nepravilnosti v zgradbi eritrocitov) in ekstrakorpuskularne hemolitične anemije (na hemolizo vplivajo zunanji dejavniki). Glavni znak hemolitične anemije pa je vedno skrajšana življenjska doba eritrocitov.



#### *2.3.5.2. Aplastična anemija*

Aplastična anemija (AA) je sindrom odpovedi kostnega mozga. V nasprotju s pancitopenijo zaradi drugih vzrokov je pri aplastični anemiji kostni mozeg aplastičen ali močno hipoplastičen. To pomeni, da je krvotvornih celic malo ali da jih skoraj ni. Značilno je, da ni nenormalnih celic in da preživetje krvnih celic ni bistveno krajše. Krvotvornega kostnega mozga je v celoti malo.

Po vsej verjetnosti je vzrok AA okvara multipotentnih mieloičnih matičnih celic. Te se ne dele v zadostni meri in ne dozorevajo. Obstaja več vzrokov, ki lahko povzročijo te okvare. Približno 20% je prirojenih (Fanconijeva anemija), 80% pa pridobljenih.[17]

#### *2.3.5.3. »Čista« aplastična anemija*

V redkih primerih so v kostnem mozgu okvarjene same celice rdeče vrste. Eritroblasti so maloštevilni ali pa jih sploh ne najdemo, za razliko od klasične aplastične anemije pa je število nevtrofilcev in trombocitov normalno. Prizadeti so torej le prekurzorji eritrocitov, zato slednji ne nastajajo v zadostni meri. Obstaja tako prirojena kot tudi pridobljena. Vzrok pridobljene je lahko virusna okužba, zdravila (antiepileptiki,...), novotvorba priželjca, pogost vzrok so tudi avtoimunske motnje, kjer nastajajo protitelesa proti eritroblastom.[17]

#### *2.3.5.4. Anemije pri kronični bolezni*

Anemija pri kronični bolezni (AKB) je skupen klinični sindrom, za katerega je značilno znižano železo in vezalna kapaciteta za železo v serumu ter ob tem dovolj zalog železa v kostnem mozgu. Pri nas so, kot tudi drugod v razvitem svetu, AKB med vsemi anemijami po pogostosti na drugem mestu, takoj za anemijami zaradi pomanjkanja železa. Ker AKB spremlja različne bolezni, ni mogoče govoriti o enotni etiologiji. (Anemije pri kroničnih vnetjih, anemija pri kronični odpovedi ledvic, mieloftizična anemija, anemija pri kronični jetrni bolezni, anemija pri endokrinih boleznih).[1]

### **2.3.6 Anemije zaradi drugih vzrokov**

#### *2.3.6.1 Anemije zaradi pomanjkanja beljakovin v hrani*

Sinteza hemoglobina se zmanjša šele pri skrajnem pomanjkanju beljakovin v hrani. Tovrstne anemije pri nas ni, pojavlja pa se v nerazvitem svetu.

#### *2.3.6.2 Anemije v nosečnosti*

Anemija prizadene približno 20 % vseh nosečnic, a je zaradi subtilnosti sindromov ženske ponavadi ne zaznajo, saj jo pripisujejo drugim dejavnikom. Zaradi anemije so možne razvojne motnje fetusa. Med nosečnostjo se poveča količina krvne plazme zaradi krvnega obtoka med materjo in otrokom.[1]

## **2. 4 Anemija zaradi pomanjkanja železa**

Mikrocitna anemija zaradi pomanjkanja železa je daleč najpogostejša od vseh anemij. Pogosto se pojavlja pri ženskah v rodni dobi in pri majhnih otrocih, posebno v nerazvitem svetu predstavlja velik javnozdravstveni problem

### **2. 4. 1 Patogeneza anemije zaradi pomanjkanja železa**

Ker je železo v porfirinskem obroču (hem) sestavni del molekule hemoglobina, se lahko zaradi neuravnane presnove izprazniijo zaloge železa v telesu, kar zmanjša biosintezo Hb. In tako se razvije mikrocitna hipohromna anemija zaradi pomanjkanja železa.

Pomanjkanje železa je lahko posledica:

- pomanjkanja železa v hrani;
- izgube zaradi krvavitev;
- pomanjkljive absorbcije iz hrane;

Slaba absorbcija je lahko vzrok nastanka anemije predvsem pri bolnikih z atrofičnim gastritisom ali celiakijo.

Med najpogostejše vzroke sideropenične anemije spadajo predvsem kronične izgube krvi različnih vzrokov. Pri ženskah v rodni dobi so najpogostejši vzroki anemije močne menstruacije, možne pa so tudi ginekološke krvavitve zaradi drugih ginekoloških bolezni. Vzroki za mikrocitne sideropenične anemije lahko izvirajo iz krvavitve v prebavnem traktu: ulkus, hiatalne hernije, vnetja, paraziti ali malignomi, itd. Tudi pri uživanju nekaterih zdravil lahko pride do krvavitev. Pogosto bolniki nimajo nobenih težav in je anemija prvi simptom bolezni.

#### ❖ *Klinična slika*

Med splošne znake prištevamo slabost, utrujenost, blede kožo, hitro bitje srca, utrujenost pri fizičnem delu, glavobol, kratko sapo, vrtoglavice, otrplost. Znaki so odvisni od stopnje anemije in starosti bolnika. Večkrat se razvijejo vidne spremembe v obnašanju, imenovane »pica« sindrom. V tem primeru se pri bolniku razvije želja po neobičajni hrani – led, kreda, karton, sladoleđ. Predvsem pa zaradi pomanjkanja železa trpijo celice, ki vsebujejo železo vezujoče encime. Zaradi prizadetosti celic perifernega živčevja se pojavijo parastezije, prav tako pa pride do prizadetosti celic prebavnega trakta od ust do dvanajstnika, pa tudi nastanek sploščjenih ali vdolbenih nohtov.[1]

## 2.5 Mielodisplastični sindromi (MDS)

Mielodisplastični sindromi so bolezni, pri katerih kostni mozeg ne deluje normalno in ne proizvaja dovolj krvnih celic. Normalno se celice kostnega mozga, imenovane blasti, razvijajo in zorijo v različne tipe krvnih celic, ki imajo določene naloge v telesu. Rdeče krvne celice prenašajo kisik do tkiv, bele celice se borijo proti okužbam in trombociti ustavljajo krvavitve. Pri mielodisplastičnem sindromu te blastne celice ne zorijo in niso sposobne ustreznega delovanja, zaradi česar lahko bolnike s temi sindromi mučijo utrujenost, slabokrvnost, okužbe, krvavitve in modrice.[29] Kostni mozeg v primeru bolnikov z diagnozo MDS ni sposoben odreagirati na kontrolne mehanizme, kar rezultira v neproporcionalnem številu nezrelih celic katere se zadržujejo v kostnem mozgu namesto, da bi dozorele in potovale v kri. Medtem se številu cirkulirajočih zrelih celic v krvi zmanjšuje. Zrele oblike krvnih celic ne

samo da jih je premalo lahko so tudi ne dovolj funkcionalne, ker so displastične (spremenjene oblike in velikosti). Nesposobnost krvnega mozga, da proizvaja krvne celice rezultira pomanjkanjem zdravih rdečih krvnih celic (eritrocitov), belih krvnih celic (levkocitov) in krvnih ploščic trombocitov. Bolnikom obolelim z MDS-om je pogosto potrebna transfuzija krvi ter so podvrženi razvijanju infekcij in krvavenju. Pri približno 30% bolnikov z diagnozo MDS bolezen napreduje in se razvije v akutno mieloično levkemijo (AML) zato ga imenujejo tudi prikrita levkemija. Pri večini vzroka nastanka teh sindromov ne poznamo, pojavljajo se najpogosteje pri starejših ljudeh. Mielodisplastični sindrom lahko nastane po zdravljenju z zdravili ali obsevanju zaradi drugih bolezni, opazili so ga tudi po izpostavljenosti benzenu. Pri mielodisplastičnem sindromu z več kot 30 odstotkov blastnih celic v kostnem mozgu govorimo o (sekundarni, taki, ki se je razvila iz mielodisplastičnega sindroma) akutni levkemiji.[30]

### **2.5.1 Vrste mielodisplastičnih sindromov**

Mielodisplastični sindrom pomeni, da je premalo ene vrste ali večih vrst zdravih krvnih celic v kostnem mozgu ali v krvi. Mielodisplastični sindromi vključujejo naslednje bolezni:

- Refraktarna anemija.
- Refraktarna anemija s prstenastimi sideroblasti.
- Refraktarna anemija s presežkom blastov.
- Refraktarna anemija s presežkom blastov v transformaciji.
- Refraktarna citopenija z displazijo v več celičnih vrstah.
- Mielodisplastični sindromom z delecijo kromosoma (5q).
- Neopredeljiv mielodisplastični sindrom.

Starost in preteklo zdravljenje s kemoterapijo ali radioterapijo vplivajo na tveganje za razvoj mielodisplastičnega sindroma. Dejavniki tveganja za mielodisplastične sindrome vključujejo naslednje skupine ljudi.[31]

- Moški in belci.
- Starejši od 60 let.
- Zdravljenje s kemoterapijo ali radioterapijo.



- Izpostavljenost nekaterim kemikalijam, vključno s tobačnim dimom, pesticidi, in topili kot je benzen.
- Izpostavljenost težkim kovinam, kot so živo srebro ali svinec.

❖ *Možni znaki mielodisplastičnih sindromov:*

- Težko dihanje.
- Slabost ali občutek utrujenosti.
- Koža je bolj bleda kot ponavadi.
- Podplutbe ali krvavitve.
- Lise pod kožo, ki jih povzročijo krvavitve.
- Zvišana telesna temperatura ali pogoste okužbe.

### **2.5.2 Diagnoza mielodisplastičnih sindromov glede na spremembe v krvi in krvnem mozgu**

*Refraktarna anemija:* V krvi je premalo rdečih celic, zato ima bolnik anemijo. Število belih krvnih celic in trombocitov je normalno.

*Refraktarna anemija s prstenastimi sideroblasti:* V krvi je premalo rdečih celic, zato ima bolnik anemijo. Rdeče krvne celice vsebujejo preveč železa. Število belih krvnih celic in trombocitov je normalno.

*Refraktarna anemija s presežkom blastov:* V krvi je premalo rdečih celic, zato ima bolnik anemijo. Pet odstotkov do 19% celic v kostnem mozgu je blastov ter obstaja normalno število najdenih blastov v krvi. Lahko so spremenjene tudi bele krvne celice in trombociti. Refraktarna anemija s presežkom blastov lahko napoveduje akutno mieloično levkemijo.

*Refraktarna anemija s presežkom blastov v transformaciji:* V krvi je premalo število rdečih krvnih celic, belih krvnih celic, trombocitov. Dvajset odstotkov do 30% celic v kostnem mozgu so blasti in več kot 5% celic v krvi so blastne celice. Refraktarno anemijo s presežkom blastov v transformaciji včasih imenujemo tudi akutna mieloična levkemija.

*Refraktarna citopenija z displazijo več celičnih vrst* : V krvi je premalo vsaj dveh od treh vrst krvnih celic. Manj kot 5% celic v krvnem mozgu je blastov in manj kot 1% celic v krvi je blastov. Če so prizadete rdeče krvne celice to lahko pomeni, da vsebujejo preveč železa.

*Mielodisplastični sindrom z delecijo kromosoma (5q)*: V krvi je premalo rdečih krvnih celic zato ima bolnik anemijo. Manj kot 5% celic v krvnem mozgu in v krvi so blasti. V tem primeru gre za specifično spremembo na kromosomu.

*Neopredeljiv mielodisplastični sindrom*: V krvi je premalo ene vrste krvnih celic. Število blastov v krvnem mozgu in krvi je normalno in bolezen ne sodi v nobenega od prej naštetih tipov.[31]

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

Eksperimentalni del smo opravljali na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.

Namen eksperimentalnega dela diplomske naloge je bil določitev retikulocitnega ekvivalenta hemoglobina (RET-He) s pretočno citometrijo pri treh skupinah bolnikov :

- bolnikih z mikrocitno anemijo zaradi pomanjkanja železa,
- bolnikih z mikrocitno anemijo zaradi pomanjkanja železa, ki so se zdravili s preparati železa,
- bolnikih z okvaro kostnega mozga (mielodisplastični sindrom), ki so anemični, ker kostni mozeg ne proizvaja dovolj eritrocitov ali pa so ti nefunkcionalni (displastični).

Dobljene vrednosti pa primerjati s klasičnimi hematološkimi (HB, MCV, MCHC, MCH) in biokemijskimi (serumsko železo, feritin) kazalci pomanjkanja železa.

#### **3.1 Hematološki analizator Sysmex 2100 Xe**

Sysmex 2100 Xe je hematološki nalizator, ki se uporablja za štetje celic in merjenje njihovih velikosti (slika 3.1).

Epruvete s kapilarno ali venozno krvjo z dodanim antikoagulacijskim sredstvom K<sub>3</sub>EDTA (kalijev etilendiamin tetra očetna kislina) vložimo v posebna stojala, ki vstopajo v aparat na desni strani in izstopajo na levi. Ko gredo epruvete skozi aparat se dve med njima dvigneta in premešata. Na vrhu epruвет so gumijaste kapice, ki se med prehodom skozi aparat preluknjajo. Odvzame se vzorec skozi središče gumice med tem, ko je epruveta obrnjena navzdol.





Slika 3.1: Hematološki analizator Sysmex 2100 Xe [32]

### 3.1.1 Merilni princip

Potem, ko je kri vzorčena in razredčena se premika po tankih ceveh skozi aparat. Skozi merilni del aparata – t.i. pretočno celico, prehajajo celice ena za drugo. Karakteristike celic so izmerjene s pomočjo električne impedance in laserske svetlobe. Pri prehodu celice skozi snop laserske svetlobe pride do sipanja (odboja) svetlobe in fluorescence celic, ki so bile predhodno obarvane z različnimi barvili. Fluorescenco in sipano svetlobo zaznajo posebni detektorji. Za določanje različnih celičnih parametrov je kri razdeljena znotraj aparata na merilne kanale, kot so: WBC/ BASO, WBC-4 DIFF( levkociti), IMI( immature cells-nezrele celice), RET(retikulociti), RBC(eritrociti) in NRBC(normoblasti).[32]

Aparat meri spremembo električnega toka oz. prevodnosti, do katere pride, ko delci v prevodni točki prehajajo skozi majhno odprtino v številni kapilari.

#### *Sestavni deli:*

- Merilna komora (homogena suspenzija celic);
- El. prevodna izotonična raztopina;
- Notranja (+) in zunanja (-) elektroda;
- Kapilara z odprtino.

#### *Princip:*

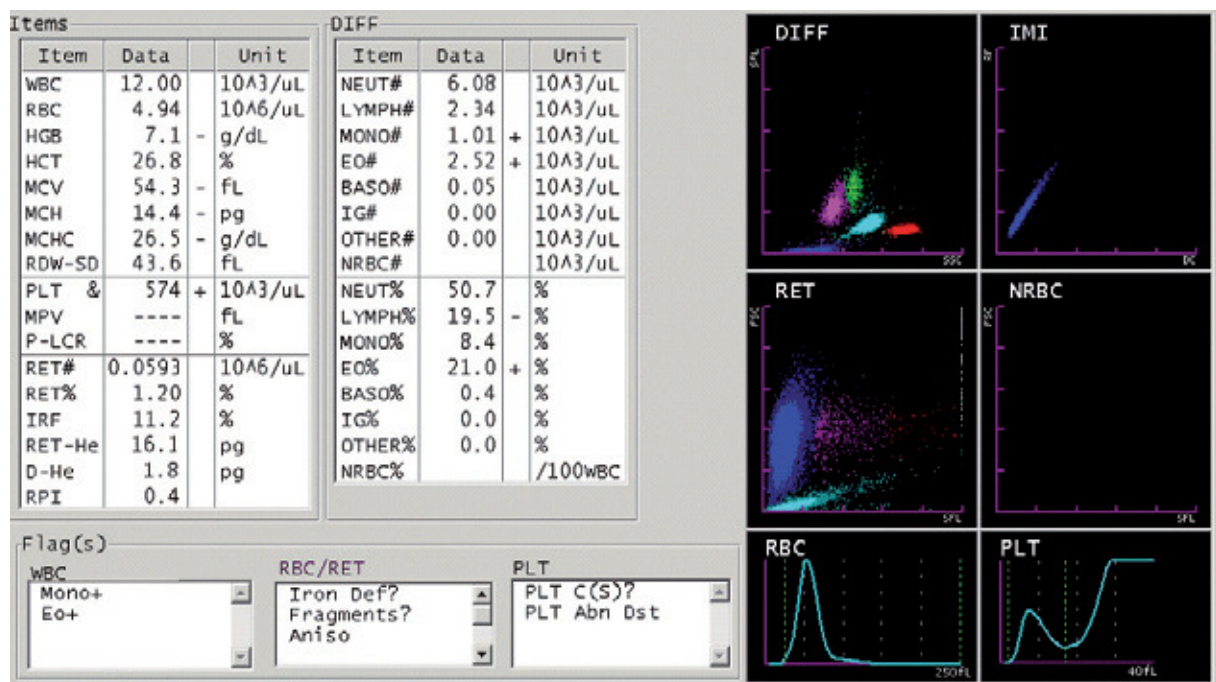
- Celica v odprtini pokaže trenutni porast upornosti in tako dobimo el impulz;
- Število impulzov nam pove število celic;

- Amplituda impulza nam poda volumen celice.

*Histogram:*

- Gre za štetje celic glede na velikost (razporeditev v podskupine);
- Nato izrišemo porazdelitveno krivuljo, kjer se določi tudi povprečni volumen celice;
- S tem dobimo SD in izračuna se razpršenost volumna okoli srednje vrednosti ( $KV = x100/SD$ );

Indeks variacije velikost celice nam pove, kako so celice razporejene levo in desno od sredine. Rezultati meritev se prikažejo v obliki točkovnih diagramov in izpišejo se vrednosti posameznih parametrov.



Slika 3.2: Krvna slika s pomočjo računalniškega programa [43]

### 3.2 Pomen hematoloških kazalcev in principi meritev

Hematološka preiskava, ki se imenuje kompletna krvna slika (KKS) vključuje štetje krvnih celic: eritrocitov, levkocitov in trombocitov. Poleg tega kompletna krvna slika zajema tudi merjenje koncentracije hemoglobina v krvi iz katere se v kombinaciji s številom eritrocitov ter volumskim deležem eritrocitov (hematokrit) izračunajo hematološki parametri: MCV (hematokrit / eritrociti), MCH (hemoglobin / eritrociti), MCHC (hemoglobin / hematokrit).

Vrednosti teh parametrov olajšajo diagnostiko anemij, ker dajejo informacije o velikosti in vsebnosti hemoglobina v eritrocitih.[33]

### **3.2.1 Določevanje številčne koncentracije eritrocitov v krvi**

- *Klinični pomen*

Glavna naloga eritrocitov je prenos kisika iz pljuč v tkiva in prenos ogljikovega dioksida iz tkiv v pljuča. Vrednosti številčne koncentracije eritrocitov v krvi so odvisne od fizioloških faktorjev (starost, teža, telesna ali psihična aktivnost, spol), od sestave zraka in od raznih vrst bolezni. Vrednosti številčne koncentracije eritrocitov so lahko normalne, zvišane ali znižane. Znižane številčne koncentracije – eritropenije (anemije) so običajno posledica:

1. krvavitev
2. razpadanja (hemolize) eritrocitov
3. strjevanja eritrocitov
4. spremenjenega nastajanja eritrocitov (eritropoeze)

Zvišane številčne koncentracije eritrocitov – eritrocitoza so posledica bolezni, lahko pa gre za nepravilno razmerje med plazmo in celicami v krvi zaradi izgub (driske, bruhanja, znojenje, zbiranje tekočin v telesnih votlinah).[34]

- *Princip meritve*

Merjenje spremembe upornosti v raztopini elektrolita. V izotonično raztopino elektrolita sta potopljeni dve elektrodi, ločeni s stekleno kapilaro. Kapilara je odprta le v eni točki, skozi katero zaradi vakuuma teče tok skupaj s suspendiranimi delci. Med elektrodama teče enosmerni električni tok. Zaradi hidrodinamskega fokusiranja se celice gibljejo linearno ena po ena skozi odprtino. Na vsaki strani odprtine imamo tok reagenta (front sheat, back sheat), ki preprečuje uhajanje celic in omogoča laminarni tok suspenzije. Pri prehodu celice skozi odprtino se poveča upornost. To registriramo kot spremembo signala na elektrodi. Sprememba je sorazmerna številu celic, velikost signala je odvisna od velikosti celic. Hidrodinamsko fokusiranje izboljšuje natančnost in ponovljivost metode in preprečuje pojav lažnih signalov. Referenčne vrednosti se gibljejo v intervalu:  $4,2 - 6,3 \times 10^{12} / L$  .[34]

### 3.2.2 Določevanje koncentracije hemoglobina v krvi

- *Princip meritve*

Kapilarna ali venozna kri odvzeta z dodanim antikoagulacijskim sredstvom K<sub>3</sub>EDTA (kalijev etilendiamin tetra očetna kislina). SLS (*sodium lauryl sulfate, Na dodecil sulfat - CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OSO<sub>3</sub>Na*) lizira eritrocite in spremeni konformacijo hemoglobina. To se oksidira v hemiglobinsulfat. SLS v raztopini tvori s hemiglobinsulfatom stabilno kompleksno spojino SLS – Hb. Metoda je hitra, prav tako se oksidirajo tudi derivati hemoglobina. Meri se absorbanca raztopine pri valovni dolžini 555 nm. Rezultate podajamo v g/L.[35]

### 3.2.3 Določevanje hematokritne vrednosti HCT v krvi

- *Klinični pomen*

Hematokritna vrednost je prostorninski delež eritrocitov v enoti polne krvi. Odvisna je od števila eritrocitov in zato je njena vrednost odvisna od faktorjev, ki vplivajo na vrednost eritrocitov.

Hematokritna vrednost je pomembna pri anemijah, kjer je znižana. Pri zgostitvah krvi (hemokoncentracijah), pri izgubljanju tekočine (znojenje, bruhanje, driske, opekline, zbiranje eksudatov in transudatov) ali drugih vzrokih, je hematokritna vrednost zvišana.

Hematokritna vrednost se lahko uporabi tudi za grobo oceno vrednost hemoglobina in sicer je hematokritna vrednost tri kratna vrednost hemoglobina.[36]

- *Princip meritve*

Višina impulza, ki ga aparat detektira pri prehodu eritrocita skozi odprtino na kapilari v merilni komori RBC / PLT je sorazmerna prostornini eritrocita. Vsota višin predstavlja hematokritno vrednosti HCT.

Višina impulza je odvisna tudi od sferičnih faktorjev. Eritrociti, ki imajo nizke vrednosti koncentracij hemoglobina, se v merilni komori bolj deformirajo v obliko cigare in dajejo nižje vrednosti impulzov, s tem pa manjše volumne. Sferociti in eritrociti z visokimi vsebnostmi hemoglobina ali eritrociti z okvarjenimi membranami pa se težje deformirajo in dajejo višje vrednosti impulzov in s tem višje volumne. To vpliva na izračun hematokritne vrednosti.

Referenčne vrednosti se gibljejo v mejah: 0,370 – 0,540.[36]

### 3.2.4 Določevanje MCV v krvi

Meritve MCV so pomembne pri določevanju:

- Mikrocitoze: kronične bolezni, talasemija, pomanjkanje železa, fragmentacija eritrocitov, hemoglobin H bolezen,
- Makrocitoze: aplastična anemija, prelevkemija, pomanjkanje folatov, pomanjkanje B<sub>12</sub>, imunska hemolitična anemija, hladna aglutinacija, KLL
- Normalen MCV: normalno, kronične bolezni, hemoglobinopatije, transfuzija, kemoterapija, KLL, KML, hemoragija, hereditarna sferocitoza, pomanjkanje različnih snovi, pomanjkanje železa ali folatov, mielofibroza, sideroblastna anemija. [37]

- *Princip meritve*

Izračun iz številčne koncentracije eritrocitov (RBC) in vrednosti hematokrita (Hct) krvi.

Enačba za izračun MCV:

$$MCV = Hct \cdot 10 / RBC \quad (fL) \quad (3.1)$$

Referenčna vrednosti se gibljejo v intervalu: 81 – 94 fl (1 fL = 10<sup>-15</sup> L).[37]

### 3.2.5 Določevanje MCHC v krvi

- *Klinični pomen*

MCHC vrednost izraža delež hemoglobina v povprečnem eritrocitu glede na njegovo celotno maso. Eritrocit je lahko le do neke mere napolnjen s hemoglobinom, zato so vrednosti MCHC navzgor omejene.

Vrednost MCHC izračunamo iz koncentracije hemoglobina in iz vrednosti hematokrita. [38]

- *Princip meritve*

Izračun iz koncentracije hemoglobina in vrednosti hematokrita.

Enačba za izračun:

$$MCHC = Hb / Hct \quad (g/L) \quad (3.2)$$

### 3.2.6 Določevanje MCH

- *Klinični pomen*

Hemoglobin predstavlja 98% vseh beljakovin v eritrocitih. Iz vrednosti hemoglobina in števila eritrocitov v krvi se izračuna MCH. MCH pove, koliko je povprečno hemoglobina v eritrocitu. Slabo polnjeni eritrociti imajo nizke vrednosti MCH in jih v razmazu najdemo kot hipohromne, močno polnjeni eritrociti imajo visoke vrednosti MCH in jih v razmazu najdemo kot polihromatske. Vrednosti MCH so odvisne od fiziološke starosti pacientov ter od faktorjev, ki vplivajo na vrednosti hemoglobina in nastajanja eritrocitov v krvi.[39]

- *Princip meritve*

Izračun iz številčne koncentracije eritrocitov (RBC) in vrednosti hemoglobina (Hb) v krvi.

Enačba za izračun:

$$MCH = Hb / RBC \text{ (pg)} \quad (3.3)$$

Referenčna vrednosti se gibljejo v intervalu:  $26 - 32 \cdot 10^{-12}$  g.[39]

### 3.3 Analiza retikulocitov

- *Klinični pomen*

Retikulociti so celice rdeče vrste brez jedra. Nastajajo v kostnem mozgu v procesu eritropoeze. Mladi retikulociti so nekoliko večji od zrelih eritrocitov in imajo retikulofilamentozno snov zbrano v klobčič ali v mrežo. V zrelih retikulocitih vidimo le še nepopolno mrežo ali sploh samo še zrnca. Po obliki in velikosti so podobni zrelim eritrocitom, vendar za razliko od zrelih eritrocitov še vedno vsebujejo nukleinske kisline.

Iz števila retikulocitov ocenjujemo obseg eritropoeze. Omogoča nam:

- razlikovanje anemij zaradi zmanjšane proizvodnje eritrocitov od anemij zaradi zvečane razgradnje ali izgube eritrocitov,
- oceno uspešnosti zdravljenja anemij,
- oceno obnovitvene sposobnosti kostnega mozga po zaviralnem delovanju zdravil in presaditvi kostnega mozga. [40]

- *Princip meritve*

V citoplazmi mladih eritrocitov so še ostanki RNA- ribonukleinske kisline, v obliki mreže ali zrn, ti se v posebnem merilnem (RET) kanalu obarvajo z dvema barviloma (polimetin in oksazin). Barvili se po predhodni permeabilizaciji (predrtju) celičnih membran, vezeta na nukleinske kisline. Zreli eritrociti, ki ne vsebujejo nukleinskih kislin, se ne obarvajo. Obarvani retikulociti pri prehodu skozi laserski žarek oddajajo fluorescenco in sipajo svetlobo. Sipanje svetlobe pod majhnim kotom (FSC) je sorazmeren velikosti celice.

Retikulociti so glede na intenziteto fluorescence (vsebnosti RNA) razdeljeni na tri območja: LFR, MFR in HFR. Vsota števil MFR in HFR je predstavljena kot delež nezrelih retikulocitov (IRF).[32]

### 3.3.1 Številčna vrednost retikulocitov

- *relativno število retikulocitov;*

aparati prešteje retikulocite in izsledek navede v odstotkih

- *absolutno število retikulocitov;*

to število dobimo tako, da relativno število retikulocitov pomnožimo s številom eritrocitov v istem vzorcu

$$\text{štev. retikulocitov} / L = (\% \text{ retikulocitov} \times \text{število eritrocitov} / L) / 100 \quad (3.4)$$

Referenčne vrednosti:

Ret = retikulociti absolutno      21,0 – 94,0 x 10<sup>9</sup> / L

Ret- r = retikulociti relativno      0,2 – 2,0 %

Povečano število retikulocitov v periferni krvi je zagotov pokazatelj regenerativne eritropoeze. Manjše število retikulocitov pa je znak neučinkovite eritropoeze in se pogosto pojavlja pri neregenerativnih anemijah, npr. anemijah zaradi pomanjkanja železa, bakra, vitamina B6, vitamina B12 ali folata prav tako pri anemijah zaradi kroničnih bolezni (kronično vnetje, maligni tumorji, kronične poškodbe ledvic, aplastična anemija).[41]

### 3.4 Klinični pomen določevanja retikulocitnega ekvivalenta hemoglobina

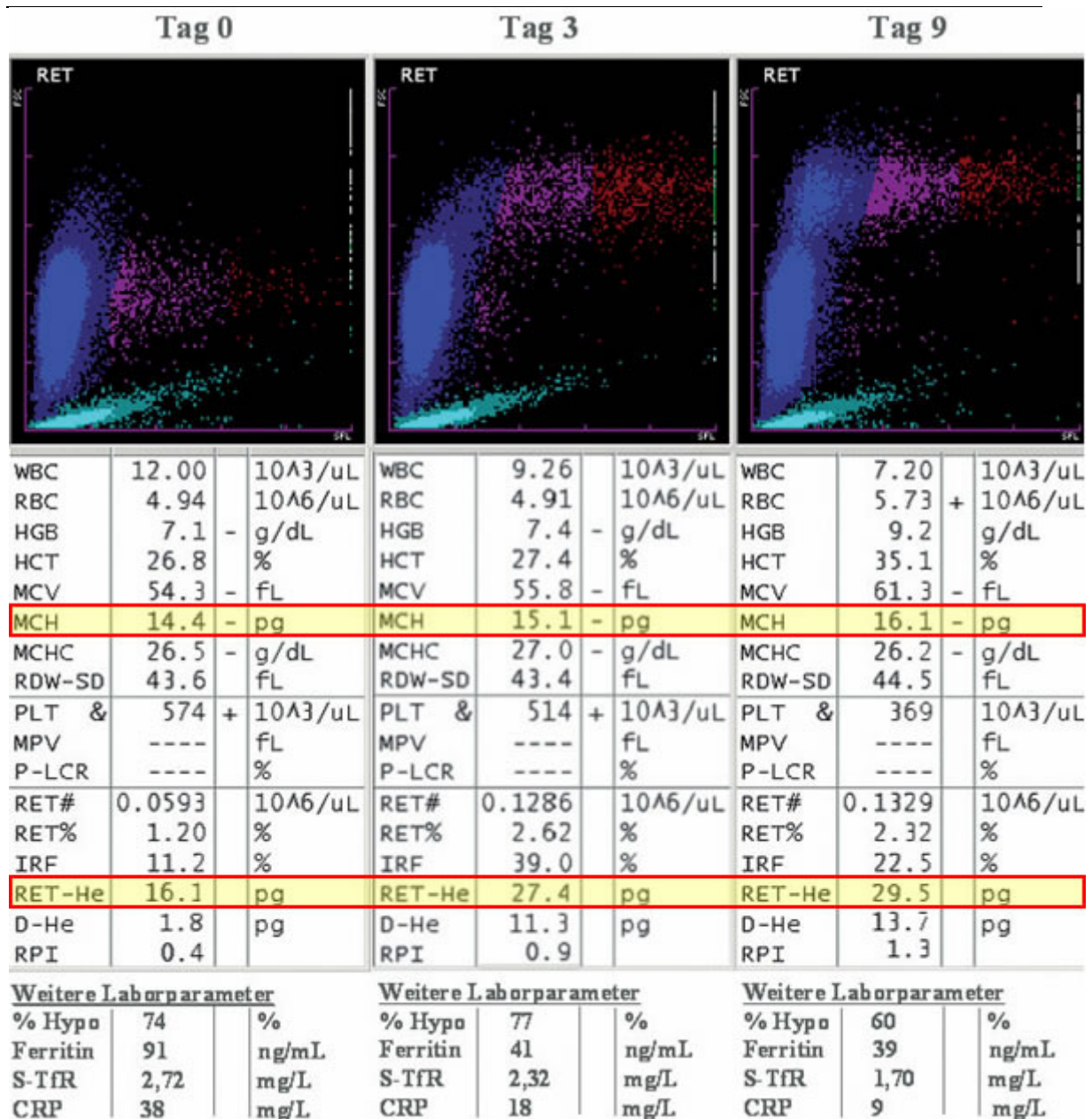
#### RET He za oceno pomanjkanja železa v telesu

Z meritvami vsebnosti hemoglobina v znanilcih rdečih krvnih celic (RBC) (pg) lahko prepoznamo že zgodnje faze pomanjkanja železa, medtem ko drugi biokemični parametri niso informativni.[42] Do sedaj ni bila na razpolago nobena metoda, s katero bi lahko ugotavljali biokemično pomanjkanje železa, razen ocenjevanje zalog železa v kostnem mozgu s pomočjo invazivne biopsije. Predvsem v stanjih t.i. funkcionalnega pomanjkanja celičnega železa, kjer gre za neravnovesje med potrebami in oskrbo kostnega mozga z železom. Kadar je potreba po oskrbi z železom povečana zaradi povečane sinteze hemoglobina in retikuloendotelni sistem ni sposoben sprostiti tolikšne količine železa kljub zadostnim ali celo povečanim zalogam, govorimo o funkcionalnem pomanjkanju železa.[28]

Retikulociti so prekurzorji eritrocitov, zato so v primeru pomanjkanja železa prve celice, ki postanejo anemične. Ko kostnemu mozgu prične primanjkovati železa, retikulociti v periferni krvi to nakažejo že po dveh dneh. Parameter RET-He pokaže trenutno oskrbo eritropoeze z železom v kostnem mozgu. Je takojšnji pokazatelj pomanjkanja železa v eritropoezi (real-time parameter).[44]

Če testiramo retikulocite in zrele eritrocite, lahko ugotavljamo in sledimo akutne in kronične spremembe v statusu celičnega hemoglobina, saj direktno ugotavljamo vgrajevanje železa v eritrocitni hemoglobin in imamo tako enostavno in direktno vpogled v funkcionalno razpoložljivo železo v eritronu. S to metodo lahko spremljamo odziv kostnega mozga na zdravljenje s preparati železa.





Slika 3.3: Primerjava RET He s hematološkimi in biokemijskimi parametri pred in po zdravljenju z intravenoznim železom [43]

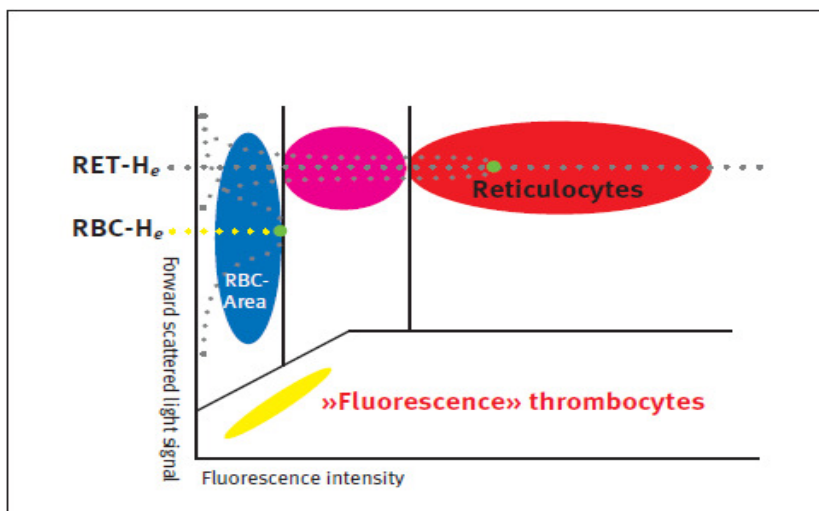
Na sliki 3.3 vidimo, da tretji dan po začetku terapije klasični hematološki parametri ne kažejo sprememb ali pa so te neznatne. Kar kaže na to, da so ti parametri neprimerni za takojšnjo oceno terapije (real-time parameter). V nasprotju s klasičnimi parametri pa RET-He kaže trenutno oskrbo kostnega mozga z železom z znatnim porastom glede na začetno vrednosti. Kar pomeni, da telo že porablja dobljeno železo za sintezo hemoglobina. [43]

RET- He (retikulocitni ekvivalent hemoglobina) izmerjen na hematološkem analizatorju Sysmex 2100 Xe je analogen parametru CHr (količina hemoglobina v retikulocitih), ki je parameter omogočen s strani hematološkega analizatorja Bayer Advia 2120. [44]

Največ podatkov o uporabnosti novih hematoloških kazalcev pomanjkanja železa najdemo pri: 1. zdravljenju z r-HuEPO, 2. odkrivanju pomanjkanja železa pri anemiji ob kroničnih boleznih, 3. v zgodnjem otroštvu, kjer je pomanjkanje železa z anemijo ali brez povezano z motnjo kognitivnega razvoja otroka, in 4. pri odkrivanju nedovoljenega uživanja sredstev, ki povečujejo telesno zmogljivost v športu (doping).[28]

### 3.4.1 Princip meritve

Vrednost parametra RET- He se oceni v merilnem (RET) kanalu glede na velikost retikulocitov (forward scatter). Velikost retikulocitov analizator določi, po predhodnem obarvanju, glede na sipanje svetlobe pod majhnim kotom (FCS) pri prehodu retikulocitov skozi laserski žarek v pretočni celici..



Slika 3.4 : Določevanje RET-He na Sysmex-2100 Xe z merjenjem intenzivnosti razpršene laserske svetlobe pod majhnim kotom.

Referenčna vrednost: 28- 35 pg.[43]

### 3.4 Pomen biokemijskih kazalcev in principi meritev

Kri je sestavljena iz celic in krvne plazme. Feritin in transferin sta plazemska proteina na katera je vezano železo. Vrednosti feritina in serumskega železa, ki ga dobimo po sprostitvi iz transferina, sta kazalca vsebnosti železa v telesu.

Krvni serum ali skrajšano serum je tekoča frakcija krvi, ki so ji s centrifugiranjem odstranjene krvne celice (rdeče krvničke, bele krvničke, krvne ploščice) in faktorji strjevanja krvi (fibrinogen).

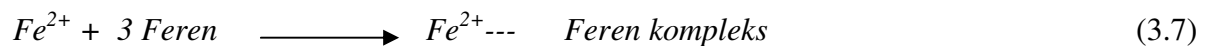
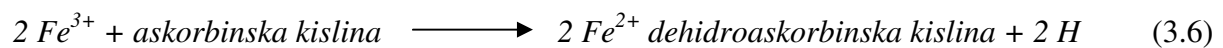
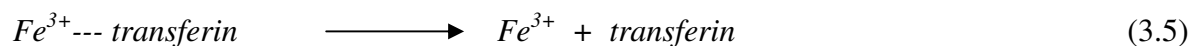
Meritve biokemijskih parametrov železa in feritina v krvnem serumu so bile izvedene na biokemijskem analizatorju Dimension RXL- MAX.

#### 3.4.1 Določevanje železa v krvnem serumu

- *Princip meritve*

V kislem mediju se iz transferina sprostijo  $Fe^{3+}$  ioni, ki se ob prisotnosti askorbinske kisline reducirajo v  $Fe^{2+}$  ione. Slednji tvorijo moder kompleks s Ferenom, katerega absorbanco merimo bikromatično pri 600 in 700 nm. Izmerjena absorbanca je sorazmerna s koncentracijo železa v vzorcu.[45]

#### *Reakcija*



Referenčna vrednost:

- v serumu pri 37 °C:   moški: 11,6 – 31,3  $\mu\text{mol/L}$   
                                  ženske: 9,0 – 30,4  $\mu\text{mol/L}$  [45]

### 3.4.2 Določevanje feritina v krvnem serumu

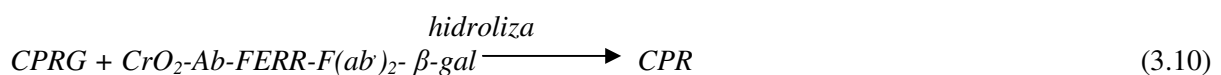
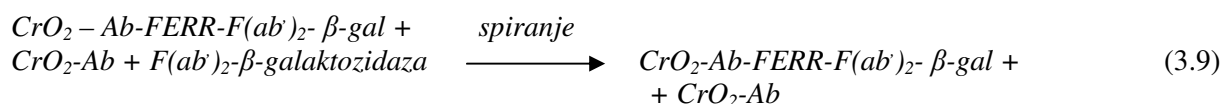
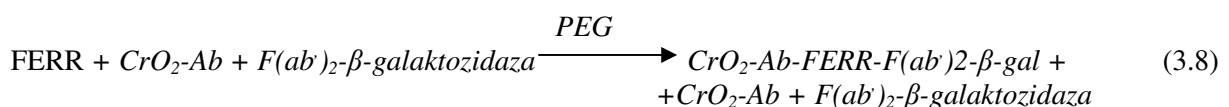
- *Klinični pomen*

Serumski feritin je indikator zaloga železa v telesu. Koncentracija feritina pod 20 µg/l vedno kaže na pomanjkanje železa, visoke koncentracije feritina pa kažejo na prekomerno odlaganje železa v telesu (idiopatska hemokromatoza, in pogoste transfuzije krvi, poškodbe jeter - npr. metastaze v jetrih). Feritin lahko torej tudi loči anemijo zaradi pomanjkanja železa od anemij zaradi kroničnih bolezni.[46]

- *Princip meritve*

Vzorec se inkubira z delci kromovega dioksida, vezanimi na monoklonalna protitelesa (specifična za feritin), in konjugiranim reagentom (β galaktozidaza – monoklonalna protitelesa, specifična za druga vezavna mesta feritina). Tvori se kompleks dioksid-feritin-konjugat. Nevezani konjugat in analit se odstranita z magnetno separacijo in spiranjem. Vezana β-galaktozidaza se poveže s kromogenim substratom klorofenol rdeče-C-d-galaktopiranozid (CPRG), katerega hidroliza sprosti kromofor (CPR). Koncentracija feritina v vzorcu je sorazmerna s koncentracijo sproščenega kromofora in intenziteto nastalega barvnega kompleksa, ki ga merimo pri 577 in 700 nm.[46]

#### Reakcija



#### Referenčna vrednost

- v serumu pri 37 °C: ženske: 8 – 252 µg/L  
moški: 26 – 388 µg/L [46]



## 4. REZULTATI Z DISKUSIJO

### 4.1 Rezultati meritev pri nezdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Preglednica 4.1: Izmerjeni hematološki parametri pri nezdravljenih bolnikih

Bolnik	RBC ( $10^{12}$ )/L	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCHC (g/L)	MCH (pg)	REHe (pg)	Ret-r (%)	Ret $10^9$ /L
A1	4.50	72	60.2	266	16.0	15,4	0.85	38.3
A2	3.32	72	73.5	295	21.7	17,6	2.2	73.0
A3	4.38	103	75.1	313	23.5	19,8	0.65	28.5
A4	2.57	47	72.0	254	18.3	14,8	0.84	21.8
A5	3.17	92	77.8	304	25.1	22,6	0.95	41.6
A6	4.86	107	73.7	299	22.0	21,3	0.58	28.2

Preglednica 4.2: Izmerjeni biokemijski parametri pri nezdravljenih bolnikih

Bolnik	Serumsko železo ( $\mu$ mol/L)	Feritin ( $\mu$ g/L)
A1	1.5	2
A2	2.3	25
A3	3.0	5
A4	3.5	5
A5	4.2	17
A6	1.5	9

### 4.2 Rezultati meritev pri zdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Preglednica 4.3: Izmerjeni hematološki parametri pri zdravljenih bolnikih

Bolnik	RBC ( $10^{12}$ )/L	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCHC (g/L)	MCH (pg)	RET- He(pg)	Ret-r (%)	Ret ( $10^9$ /L)
B1	4.88	150	90.2	341	30.7	34.3	1.61	78.6
B2	4.36	127	89.4	326	29.1	39.9	0.85	37.1
B3	4.44	134	91.4	330	30.2	30.1	0.62	27.5
B4	4.88	139	85.7	333	28.5	31.4	1.11	54.2
B5	4.87	142	91.8	318	29.2	36.7	1.31	63.8
B6	4.70	140	91.3	326	29.8	33.7	1.28	60.2

Preglednica 4.4: Izmerjeni biokemijski parametri pri zdravljenih bolnikih

Bolnik	Serumsko železo ( $\mu\text{mol/L}$ )	Feritin ( $\mu\text{g/L}$ )
B1	23.8	36
B2	11.8	38
B3	8.5	22
B4	9.2	58
B5	2.6	27
B6	12.8	25

### 4.3 Rezultati meritev pri bolnikih z MDS

Preglednica 4.5: Izmerjeni hematološki parametri pri bolnikih z MDS

Bolnik	RBC ( $10^{12}/\text{L}$ )	HGB (g/L)	MCV (fL)	MCHC (g/L)	MCH (pg)	RET-He(pg)	Ret-r (%)	Ret ( $10^9/\text{L}$ )
C1	3.17	92	85.8	338	29.0	28.6	0.15	4.8
C2	2.82	95	99.3	339	33.7	33.8	1.17	33
C3	2.03	69	107.9	315	34.0	28.3	4.42	89.7
C4	2.76	79	86.6	331	28.6	29.1	0.20	5.5
C5	3.23	88	88.2	309	27.2	28.2	0.46	23.9

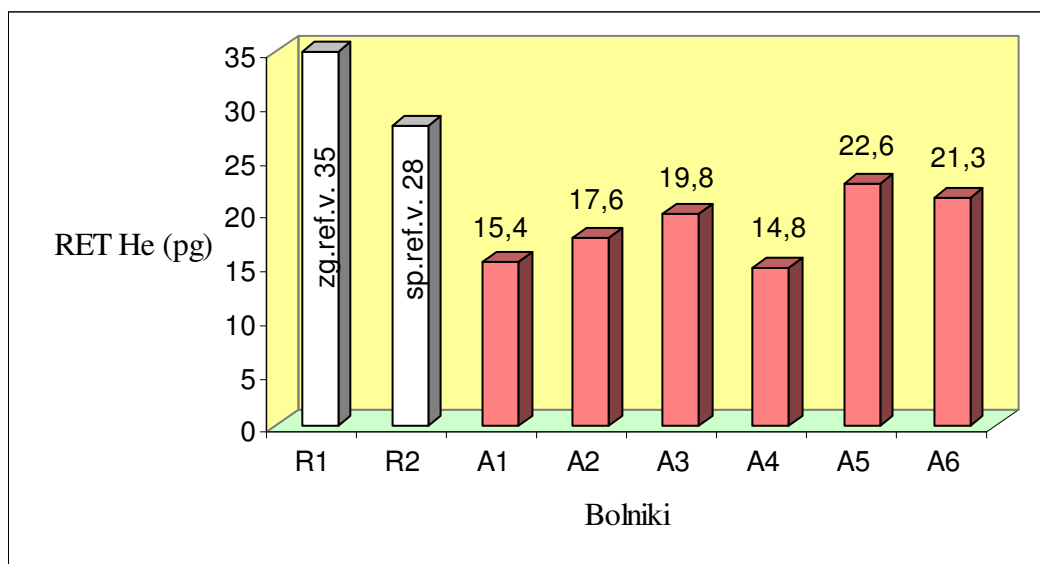
Preglednica 4.6: Izmerjeni biokemijski parametri pri bolnikih z MDS

Bolnik	Serumsko železo ( $\mu\text{mol/L}$ )	Feritin ( $\mu\text{g/L}$ )
C1	48.0	1582
C2	33	1694
C3	23	3279
C4	28.8	2758
C5	23.9	1867

## 4.4 Vrednotenje rezultatov

### 4.4.1 Nezdravljeni bolniki z anemijo, zaradi pomanjkanja železa

Slika 4.1 prikazuje vrednosti RET He pri nezdravljenih anemičnih bolnikih v primerjavi z referenčnimi vrednostmi.



Slika 4.1: Vrednosti RET He pri nezdravljenih bolnikih z anemijo v

Iz slike 4.1 je razvidno, da so vse vrednosti pod spodnjo referenčno vrednostjo (stolpec R2) na grafu. Kar rezultira v znižanih eritrocitnih parametrih.

Preglednica 4.7: Eritrocitni parametri pri nezdravljenih bolnikih

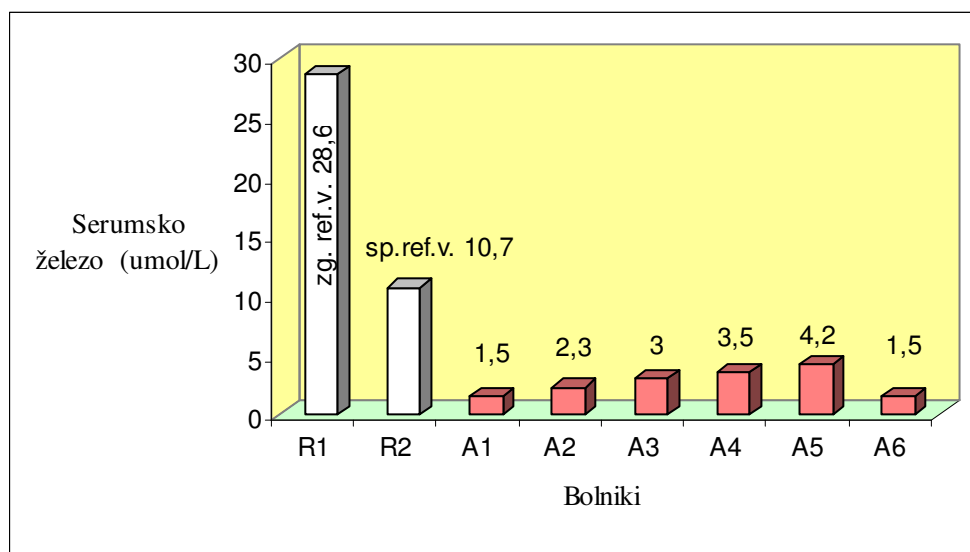
Bolnik	Hb (g/L)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	MCV (fL)
A1	72	16.0	266	60.2
A2	72	21.7	295	73.5
A3	103	23.5	313	75.1
A4	47	18.3	254	72.0
A5	92	25.1	304	77.8
A6	107	22.0	299	73.7
Referenčne vrednosti	ž.:120-160 m.:120-180	26-32	310-350	81-94



Preglednica (4.7) eritrocitnih parametrov (Hb, MCH, MCHC, MCV) kaže znižane vrednosti pod spodnje referenčne vrednosti. Razen pri bolniku A3 je vrednost MCHC rahlo nad spodnjo mejo.

Znižane vrednosti hemoglobina v retikulocitih in eritrocitih so znak zmanjšane sinteze hemoglobina v kostnem mozgu zaradi pomanjkanja železa, kar kažeta naslednji dve sliki..

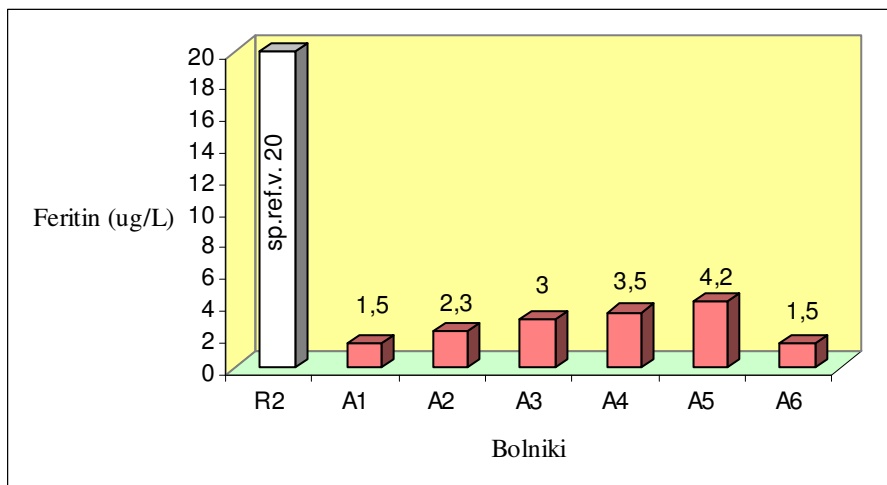
Slika 4.2 prikazuje vsebnosti serumskega železa pri nezdravljenih bolnikih z anemijo.



Slika 4.2: Vrednosti serumskega železa pri nezdravljenih bolnikih z anemijo

Iz slike 4.2 je razvidno, da so vrednosti serumskega železa močno pod spodnjo referenčno vrednostjo (stolpec R2) na grafu.

Slika 4.3 prikazuje vrednosti feritina pri nezdravljenih bolnikih z anemijo

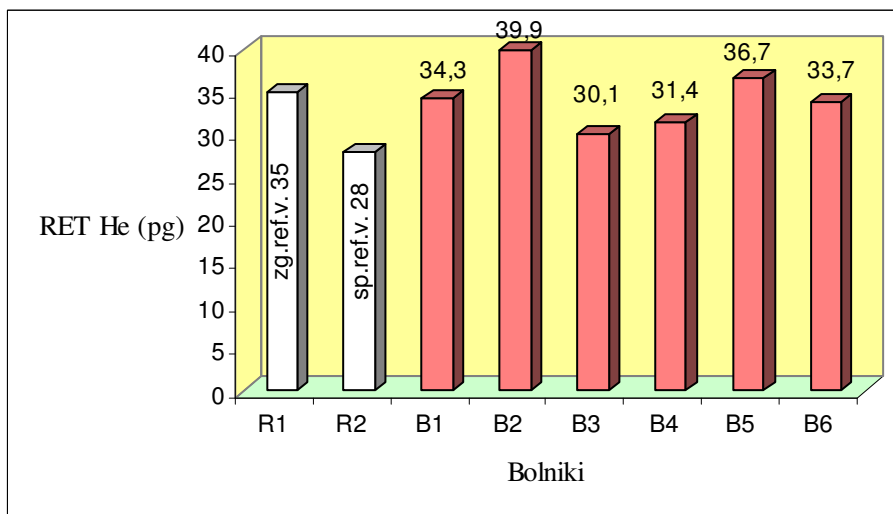


Slika 4.3: Vrednosti feritina pri nezdravljenih bolnikih z anemijo

Tudi na sliki 4.3 vidimo, da so pri vseh bolnikih vrednosti pod spodnjo referenčno vrednostjo (stolpec R2) na grafu.

#### 4.4.2 Zdravljeni bolniki z anemijo

Slika 4.4 prikazuje vrednosti RET He pri zdravljenih bolnikih z anemijo v primerjavi z referenčnimi vrednostmi



Slika 4.4: Vrednosti RET He pri zdravljenih bolnikih z anemijo

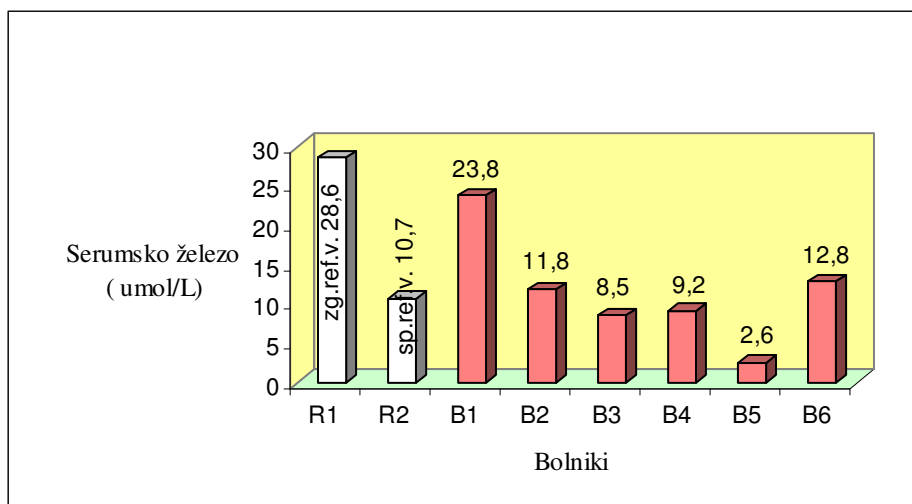
Iz slike 4.4 vidimo, da so vse vrednosti RET He nad spodnjo referenčno vrednostjo (stolpec R2) na grafu. Pri bolniku B2 in B5 celo nad zgornjo vrednostjo. Kar rezultira z normalnimi vrednostmi eritrocitnih parametrov.

Preglednica 4.8: Eritrocitni parametri pri zdravljenih bolnikih

Bolnik	Hb (g/L)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	MCV (fL)
B1	150	30.7	341	90.2
B2	127	29.1	326	89.4
B3	134	30.2	330	91.4
B4	139	28.5	333	85.7
B5	142	29.2	318	91.8
B6	140	29.8	326	91.3
Referenčne vrednosti	ž.:120-160 m.:120-180	26-32	310-350	81-94

Iz preglednice 4.8 vidimo, da so vsi parametri znotraj normalnih vrednosti.

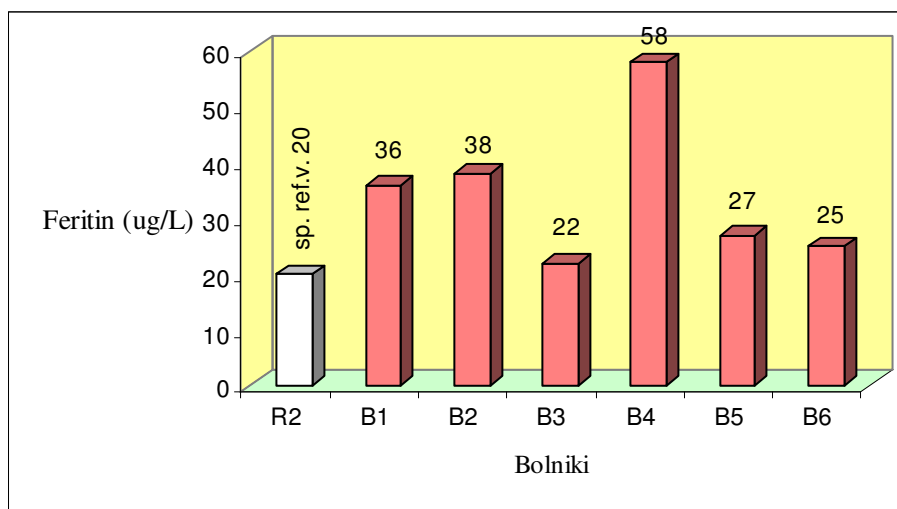
Slika 4.5 prikazuje vsebnosti serumskega železa pri zdravljenih bolnikih z anemijo.



Slika 4.5: Vrednosti serumskega železa pri zdravljenih bolnikih

Iz slike 4.5 vidimo, da so vrednosti serumskega železa pri bolnikih B3, B4 in B5 pod spodnjo vrednostjo, vendar ti bolniki nimajo funkcionalnega pomanjkanja železa kar je razvidno iz normalnih vrednosti RET He (slika 4.4).

Slika 4.6 prikazuje vsebnosti feritina pri zdravljenih bolnikih.

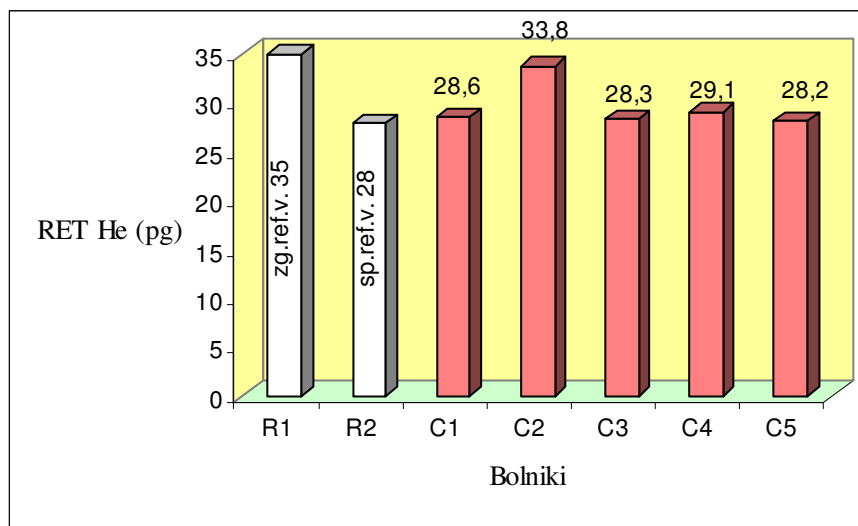


Slika 4.6: Vrednosti feritina pri zdravljenih bolnikih

Iz slike 4.6 vidimo, da so vse vrednosti feritina nad spodnjo referenčno vrednostjo. Vidimo, da bolnik B5, ki ima močno znižano vrednost serumskega železa (slika 4.5) ima normalno vrednost feritina.

#### 4.4.3 Bolniki z MDS

Slika 4.7 prikazuje vrednosti RET He pri bolnikih z mds.



Slika 4.7: Vrednosti RET He pri bolnikih z MDS

Iz slike 4.7 vidimo, da so vrednosti RET He bolj pomaknjene k spodnji referenčni vrednosti razen pri bolniku (C2), vendar še vedno v mejah normale.

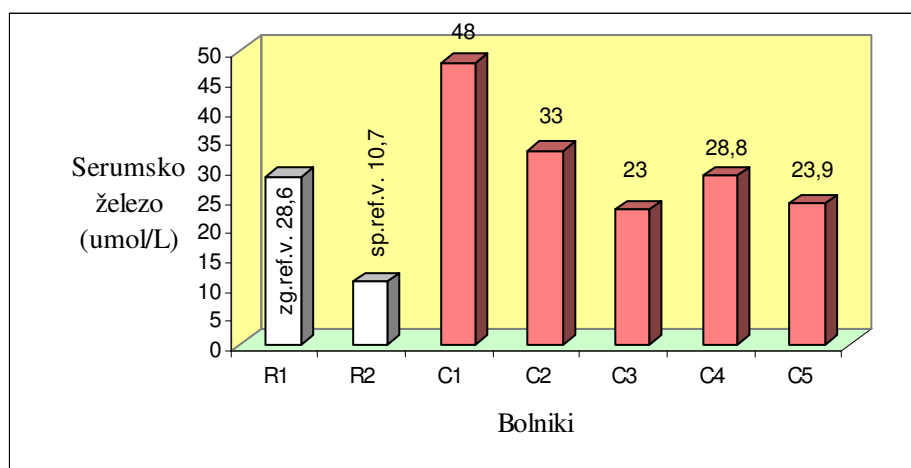
Preglednica 4.9 prikazuje eritrocitne parametre pri bolnikih z MDS.

Preglednica 4.9: Eritrocitni parametri pri bolnikih z MDS

Bolnik	Hb (g/L)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	MCV (fL)
C1	92	29.0	338	85.8
C2	95	33.7	339	99.3
C3	69	34.0	315	107.9
C4	79	28.6	331	86.6
C5	88	27.2	309	88.2
Referenčne vrednosti	ž.:120-160 m.:120-180	26-32	310-350	81-94

Preglednica 4.9 kaže nesorazmerje med eritrocitnimi parametri (MCH, MCHC, MCV) in vrednostjo hemoglobina (Hb). Pri normalnih vrednostih RET He je celotna količina hemoglobina močno znižana. Kar je posledica zmanjšane števila eritrocitov (preglednica 4.5).

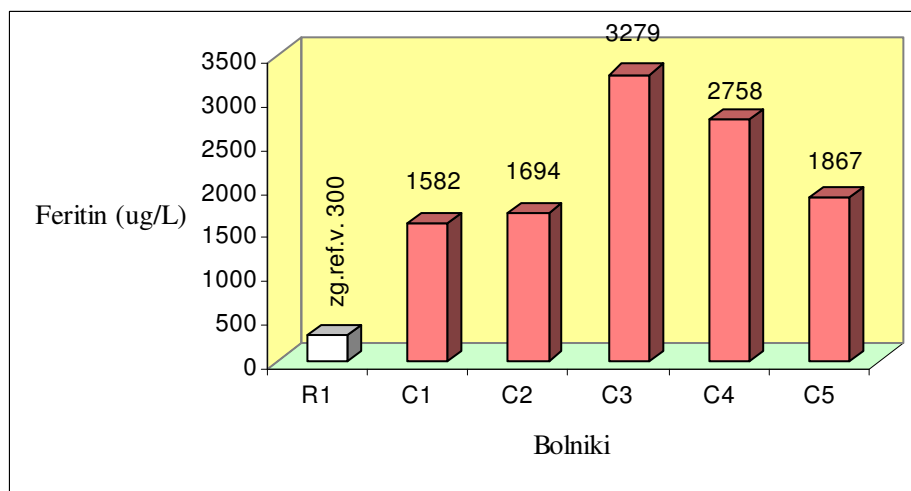
Slika 4.8 prikazuje vrednosti serumskega železa pri bolnikih z MDS.



Slika 4.8: Vrednosti serumskega železa pri bolnikih z anemijo

Iz slike 4.8 vidimo, da so vse vrednosti serumskega železa nad spodnjo referenčno vrednostjo pri bolnikih C1, C2 in C4 celo nad zgornjo.

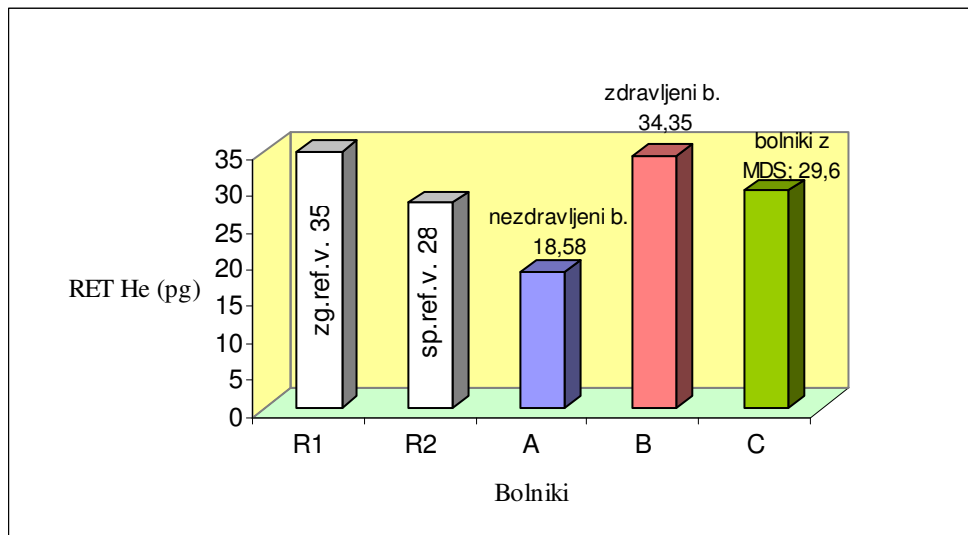
Slika 4.9 prikazuje vrednosti feritina pri bolnikih z MDS:



Slika 4.9: Vrednosti feritina pri bolnikih z MDS

Iz slike 4.9 vidimo, da so vrednosti feritina pri vseh bolnikih močno povečane nad zgornjo referenčno vrednostjo.

#### 4.4.4 Primerjava povprečnih vrednosti RET He pri vseh treh skupinah bolnikov



Slika 4.10: Povprečne vrednosti RET He pri vseh treh skupinah bolnikov glede na referenčne vrednosti.

Iz slike 4.10 vidimo, da je povprečna vrednost RET He pri nezdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa, veliko nižja kot pri zdravljenih bolnikih z isto diagnozo. Vrednost RET He pri bolnikih z MDS je večja kot pri nezdravljenih.

## 4.5 Statistična obdelava podatkov

### 4.5.1 Statistična obdelava podatkov s Pearsonovo korelacijo

Statistično smo obdelali podatke s Pearsonovo korelacijo, da bi preverili povezanost RET He z ostalimi parametri. Bolnike z anemijo zaradi pomanjkanja železa, zdravljene in nezdravljene smo vzeli v isti statistični vzorec. Bolnike z MDS smo obravnavali posebej.

Preglednica 3.10 prikazuje korelacije med RET He in eritrocitnimi (hematološkimi) ter biokemijskimi parametri pri zdravljenih in nezdravljenih bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa .

Preglednica 4.10: Statistični podatki

Parametri primerjani z RET He	$\alpha$ (stopnja tveganja pri 95% intervalu zaupanja)	r (faktor korelacije)
MCHC	0,0007	0,83
MCH	<0,0001	0,92
MCV	<0,0001	0,92
Hb	<0,0001	0,90
Serumsko železo	0,0224	0,65
Feritin	0,0068	0,73

N=12 (število bolnikov, zdravljenih + nezdravljenih). Kadar je  $\alpha < 0,05$  lahko sprejmemo hipotetično trditev.

Iz preglednice 4.10 je razvidno, da med RET He in eritrocitnimi parametri (MCHC, MCH, MCV, HGB) obstaja visoka korelacija ob nizki stopnji tveganja. Med Ret He in feritinom je nekoliko nižja ob malo večji stopnji tveganja. Med RET He in serumskim železom je večja stopnja tveganja in nižja korelacija.

Preglednica 4.11: Statistični podatki pri bolnikih z MDS

Parametri primerjani z RET He	$\alpha$	r
MCHC	0,282	0,60
MCH	0,351	0,54
MCV	0,669	0,26
Hb	0,344	0,54
Serumsko železo	0,522	-0,39
Feritin	0,830	0,13

Iz preglednice 4.11 je razvidno, da primerljivosti nismo dokazali, saj je v vseh primerih  $\alpha > 0,05$ .



#### 4.5.2 Statistična obdelava podatkov s t-testom.

Ker smo vrednosti RET He primerjali med tremi različnimi skupinami, smo podatke statistično obdelali s t-testom za neodvisne spremenljivke.

T-test je postopek s katerim preiskujemo enakost aritmetičnih sredin dveh populacij vzorcev.

Preglednica 4.12: Vrednosti RET He po skupinah ter njihove srednje vrednosti in razpon

RET He (nezdravljeni)	Skupina A	RET He (zdravljeni)	Skupina B	RET He (MDS)	Skupina C
15,4	A1	34,3	B1	28,6	C1
17,6	A2	39,9	B2	33,8	C2
19,8	A3	30,1	B3	28,3	C3
14,8	A4	31,4	B4	29,1	C4
22,6	A5	36,7	B5	28,2	C5
21,3	A6	33,7	B6		
povprečna vrednost ± standardni odklon					
18,48 ± 3,18		34,35 ± 3,56		29,60 ± 2,73	

Preglednica 4.13: Statistična obdelava podatkov s t-testom

Primerjane skupine	A:B (nezdrav./ zdrav.)	A:C (nezdrav./MDS)	B:C (zdrav./ MDS)
$\alpha$	<0,0001	<0,0001	0,0319

Iz preglednice 4.13 vidimo, da sta skupini zdravljenih in MDS primerljivi ob znatno večjem tveganju.

## **5.ZAKLJUČEK**

V nalogi smo primerjali nov hematološki parameter RET He, ki meri vsebnost hemoglobina v retikulocitih, predhodnikih rdečih krvnih celic (eritrocitov). Pove ali ima kostni mozeg dovolj železa, da lahko tvori eritrocite z normalno vsebnostjo hemoglobina in s tem normalno kapaciteto vezave kisika za tkiva.

Pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa so rezultati pokazali visoko korelacijo med RET He in eritrocitnimi parametri ( $r=0,83-0,92$ ). Ugotovili smo, da so visoke vrednosti RET He pri zdravljenih bolnikih korelirale z visokimi vrednostmi eritrocitnih parametrov, nizke vrednosti RET He pri nezdravljenih pa z nizkimi vrednostmi eritrocitnih parametrov. Pozitivno in veliko korelacijo smo ugotovili med RET He in feritinom, med serumskim železom je bila veliko nižja ( $r = 0,64$ ). Iz rezultatov je razvidno, da obstajajo statistično pomembne razlike med skupinami bolnikov. Predvsem se vrednosti RET He statistično pomembno razlikujejo med skupinama zdravljenih in nezdravljenih bolnikov z anemijo zaradi pomanjkanja železa. Slednje kaže na to, da je RET He parameter, ki razlikuje obe skupini in omogoča spremljanje ustreznosti zdravljenja anemije z železom. Posebej je po podatkih iz literature koristen v obdobju, ko so eritrocitni parametri še znižani (slika 3.3), kar je velika prednost te metode pred punkcijo kostnega mozga

Pri bolnikih z MDS smo izmerili relativno visoke vrednosti RET He. Pri tej skupini bolnikov kostni mozeg ne tvori dovolj normalno velikih eritrocitov z normalno vsebnostjo hemoglobina. Eritrociti so pri večini bolnikov makrocitni. Ker vemo, da hematološki analizator meri vrednost RET He glede na velikost celice, lahko RET He kaže lažne vrednosti. Predvsem, ko gre za makrocitose med katere sodi tudi MDS. Pri tej skupini bolnikov pa obstaja še dodaten problem. Večina teh prejema transfuzije eritrocitov vsaj enkrat mesečno. Tako prejmejo še tuje eritrocite različne starosti in tudi velikosti. Zato pri primerjanju RET He z eritrocitnimi parametri moramo tudi to upoštevati. Smatramo, da ta metoda določanja za to skupino bolnikov ni primerna.

Ker gre za nov parameter na analizatorju Sysmex 2100 Xe in ne obstaja dovolj statističnih podatkov o njegovem vrednotenju, ostaja široko odprto področje za nadaljnje raziskave. Vsekakor bi bilo zanimivo raziskati njegove vrednosti pri različnih diagnozah anemij pred med in po fazi zdravljenja. Le tako bi lahko bolj zagotovo trdili o njegovi teži pri zdravljenju anemij.

## 6. UPORABLJENI VIRI IN LITERATURA

- [1] Anemije, Medicinska fakulteta, Slomškov trg15, 2000 Maribor [svetovni splet], Dostopno na: <http://www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/Anemije.pdf> [5.10.2008]
- [2] Železo in telo – železo v prehrani in krvi [svetovni splet], Dostopno na: <http://www.cenim.se/243-a.html> [17.11.2008]
- [3] Kri –naloge krvi [svetovni splet], Dostopno na: <http://freeweb.siol.net/memo/kri.htm> [12.12.2008]
- [4] Kri – Wikipedija [svetovni splet], Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kri> [10.1.2009]
- [5] Blood transfusion [svetovni splet], Dostopno na: [www.britannica.com/EBchecked/topic-art/535912...](http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/535912...) [27.1.2009]
- [6] Stem cells, Wikipedia [svetovni splet], Dostopno na: [http://en.wikipedia.org/wiki/Stem\\_cells#Types](http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cells#Types) [3.2.2009]
- [7] Stem cells [svetovni splet], Dostopno na: <http://stemcells.nih.gov/info/basics.asp> [5.10.2008]
- [8] Stem cells [svetovni splet], Dostopno na: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/execSum.asp> [17.11.2008]
- [9] Stem cells [svetovni splet], Dostopno na: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp> [12.12.2008]
- [10] Burmester, Gerd-Rüdiger, Color atlas of immunology, Stuttgart, New York, Thieme, cop. 2003, str. 2
- [11] Vozelj M., Temelji imunologije, Ljubljana, DZS 2000, str. 23,24
- [12] From stem cells to blood cell [svetovni splet], Dostopno na: [www.harunyahya.com/.../blood\\_heart\\_02.php](http://www.harunyahya.com/.../blood_heart_02.php) [12.12.2008]
- [13] Eritrocit, Wikipedia [svetovni splet], Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Eritrocit> [20.10.2008]
- [14] Erythropoiesis, [svetovni splet], Dostopno na: [pimm.wordpress.com/2007/01/19/](http://pimm.wordpress.com/2007/01/19/) [5.10.2008]
- [15] Hemoglobin [svetovni splet], Dostopno na: [themedicalbiochemistrypage.org/hemoglobin-myo...](http://themedicalbiochemistrypage.org/hemoglobin-myo...) [17.11.2008]

- [16] Hemoglobin, Wikipedia, [svetovni splet], Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin> [8.12.2008]
- [17] Kocjančič Andreja, Mravlje F.: Interna medicina :DZS d.d.Ljubljana, 1998:1038-1078
- [18] Željezo – esencialni nutrient, [svetovni splet], Dostopno na: <http://www.zdrav-zivot.com.hr> [5.10.2008]
- [19] Cavill I. Erythropoiesis and iron. Best Pract Res Clin Hematol 2002; 15: 399- 409
- [20] Slabokrvnost zaradi pomanjkanja železa – sideropenična anemija , Mag. Ladko Korošec, dr.med .farmakolog, [svetovni splet], Dostopno na: <http://forum-tezave-pomagajmosi.mojforum.si/forum-tezave-pomagajmosi-post-691.html> [17.11.2008]
- [21] Hrvatsku društvo za preventivno in socialno pedijatrijo, [svetovni splet], Dostopno na: <http://www.pedijatrija.org/default.asp?ru=175&gl=200603010000002&sid=&jezik=1> [12.12.2008]
- [22] Feritin, Wikipedia, [svetovni splet], Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Feritin> [10.12.2008]
- [23] Huebers HA, Finch CA. The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiological Reviews 1987; 67: 520-81.
- [24] Analitika nukleinskih kislin, [svetovni splet], Dostopno na: [http://www.farmadrustvo.si/gradivo\\_1/Klinicna%20biokemija%20ii/I.semester/01/predavanja.doc](http://www.farmadrustvo.si/gradivo_1/Klinicna%20biokemija%20ii/I.semester/01/predavanja.doc) [5.10.2008]
- [25] Kocjančič B, Fras Z. Akutni pankreatitis. In: Keber D, eds. Zdravljenje notranjih bolezni. Algoritmi odločanja in ukrepanja. Ljubljana : Medicinski razgledi, 1993: 9/59-65.
- [26] Iron Cycle, [svetovni splet], Dostopno na: [www.cdc.gov/.../iron\\_cycle\\_popup.htm](http://www.cdc.gov/.../iron_cycle_popup.htm) [17.11.2008]
- [27] Slabokrvnost, [svetovni splet], Dostopno na: [http://www.fidimed.si/zdravstvene teme/clanki\\_strokovnjakov/7/slabokrvnost.html](http://www.fidimed.si/zdravstvene teme/clanki_strokovnjakov/7/slabokrvnost.html) [17.11.2008]
- [28] Klinični pomen novih metod (količina hemoglobina v retikulocitih in hipokromni eritrociti) za oceno pomanjkanja železa v telesu, [svetovni splet], Dostopno na: <http://vestnik.sz.d.si/st4-6/499-502.pdf> [12.12.2008]
- [28] Guyton AH, Hall JE: Textbook of medical Physiology (11th ed). Philadelphia, Pennsylvania 2006.
- [29] Akutna mieloična levkemija, [svetovni splet], Dostopno na: <http://med.over.net/forum5/read.php?26,1149225,1149232>. [17.11.2008]

- [30] Što je mds?, [svetovni splet], Dostopno na:  
<http://www.ebmt.org/5workingparties/clwp/allomds2x2/patient%20forms/croatian%20patient%20information%20leaflet.pdf> [12.12.2008]
- [31] Myelodysplastic Syndromes Treatment, [svetovni splet], Dostopno na:  
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/myelodysplastic>
- [32] Sysmex 2100 Xe, [svetovni splet], Dostopno na:  
<http://www.sysmex.com/us/521.htm>[10.1.2009]
- [33] Kompletna krvna slika, [svetovni splet], Dostopno na:  
<http://www.medikol.hr/djelatnosti/medicinsko-biokemijski-laboratorij/specificni-proteini/kompletna-krvna-slika> [10.1.2009]
- [34] Določevanje številčne koncentracije eritrocitov v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM003, 1- 4.
- [35] Določevanje koncentracije hemoglobina v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM002, 1- 4.
- [36] Določevanje hematokritne vrednost HCT v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM004, 1- 4.
- [37] Določevanje MCV v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM008, 1- 4.
- [38] Določevanje MCHC v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM007, 1- 4.
- [39] Določevanje MCH v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT- 1800i, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM006, 1- 4.
- [40] Določevanje retikulocitov s supravitalnim barvanjem, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM019, 1- 4.
- [41] Retikulociti, [svetovni splet], Dostopno na:  
[http://www.lab-breyer.hr/v2/za\\_lijecnike.asp?page\\_id=za\\_lijecnike](http://www.lab-breyer.hr/v2/za_lijecnike.asp?page_id=za_lijecnike). [10.1.2009]
- [42] Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states, [svetovni splet], Dostopno na:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1618805> [27.1.2009]

[43] Therapy Monitoring of Iron Deficiency with Ulcerativ Colitis, [svetovni splet], Dostopno na: [http://www.sysmex-europe.com/files/articles/Xtra\\_IronDeficiency.pdf](http://www.sysmex-europe.com/files/articles/Xtra_IronDeficiency.pdf) [27.1.2009]

[44] Successful Implemenation of an Anaemia Algorithm Using RET He, [svetovni splet], Dostopno na: <http://scientific.sysmex.co.jp/en/news/2008/0918.html>

[45] Določevanje železa (Fe) v serumu in plazmi na analizatorju Dimension RXL-MAX, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Centralni laboratorij, SP75SL CENO 027, 1-7.

[46] Določevanje feritina v serumu in plazmi na analizatorju Dimension RXL-MAX, UKC Maribor, Oddlek za laboratorijsko diagnostiko, Centralni laboratorij, SP75SL CENO 029, 1-6.

