

UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Anja Nadelsberger

**POMEN DOLOČANJA SERUMSKEGA ŽELEZA  
PRI SUMU NA MIKROCITNO ANEMIJO**

DIPLOMSKO DELO

Maribor, 2011



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in  
kemijsko tehnologijo*

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa

# **POMEN DOLOČANJA SERUMSKEGA ŽELEZA PRI SUMU NA MIKROCITNO ANEMIJO**

Študentka: Anja NADELSBERGER  
Študijski program: univerzitetni, Kemijska tehnologija  
Smer: Biokemijska tehnika  
Predvideni strokovni naslov: univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Mentorica: doc. dr. Marjana Glaser  
Somentor: asist. Aleš Goropevšek, dr. med.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih so posebej označeni.  
Pregledala sem literaturo iz področja diplomskega dela po naslednjih elementih:

Vir:	Science Direct, Haematologica
Gesla:	Iron deficiency anemia, serum iron, ferritin, human iron metabolism, serum transferrin
Skupine gesel (unija itd.)	Microcytic anemia
Časovno obdobje:	november 2010 – junij 2011
Število referenc:	37
Število prebranih člankov:	9
Število pregledanih knjig:	10

Maribor, junij 2011

---

Podpis študentke



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in  
kemijsko tehnologijo*

Številka: K-567  
Datum: 22.02.2011

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 1/2010)

izdajam

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

**Anja Nadelsberger**, študent-ka univerzitetnega študijskega programa KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdela diplomsko delo pri predmetu Fiziologija celice.

Mentor-ica: doc. dr. Marjana Glaser  
Somentor-ica: as. Aleš Goropevšek, dr. med.

#### Naslov diplomskega dela:

POMEN DOLOČANJA SERUMSKEGA ŽELEZA PRI SUMU NA MIKROCITNO ANEMIJO

#### Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

THE IMPORTANCE OF DETERMINING SERUM IRON IN SUSPICION OF MICROCYTIC ANEMIA

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 21.02.2012 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

#### Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:  
red. prof. dr. Željko Knez

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Marjani Glaser za vso strokovno podporo, pomoč in usmerjanje ter as. Alešu Goropevšku za pomoč pri praktičnem delu diplomske naloge.*

*Vsekakor tudi posebna zahvala vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku tega diplomskega dela, predvsem z lektoriranje in pomočjo pri grafičnem oblikovanju.*

*Posebna zahvala pa gre moji družini in Marku, za vso podporo, razumevanje ter potrpežljivost med celotnim študijem ter predvsem med nastankom tega diplomskega dela.*

## POMEN DOLOČANJA SERUMSKEGA ŽELEZA PRI SUMU NA MIKROCITNO ANEMIJO

### **Povzetek**

*Namen diplomske naloge je preučiti krvne slike bolnikov s pomanjkanjem železa in kroničnih bolnikov ter oceniti natančnost metode določanja železa. Ob tem določiti tudi retikulocite in koncentracijo feritina, vnetne pokazatelje (CRP) in ledvične teste (kreatinin). Preučili smo laboratorijske izvide desetih bolnikov z diagnozo anemije zaradi pomanjkanja železa in osmih bolnikov z diagnozo refraktorne anemije. Na ta način smo ocenili, ali je določevanje serumskega železa dejansko metoda izbora pri sumu na anemijo in ali ti bolniki potrebujejo zdravljenje z železom. S pomočjo teh ocen smo lahko predvideli natančnost metode in laboratorijskih testov.*

**Ključne besede:** železo, retikulociti, feritin, kreatinin, CRP, anemija

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

## THE IMPORTANCE OF DETERMINING SERUM IRON IN SUSPICION OF MICROCYTIC ANEMIA

*The purpose of this work is to examine the blood counts of patients with iron deficiency and chronic patients and to assess the accuracy of the method of determining iron. At the same time to determine the concentration of ferritin and reticulocyte, inflammatory indicators (CRP) and renal tests (creatinine). We studied the laboratory results of ten patients with a diagnosis of anemia due to iron deficiency and eight patients diagnosed with refractory anemia. In this way, we assessed whether the serum iron determination is the correct method of choice in suspicion of anemia, and whether these patients need treatment with iron. Using these estimates, we can predict the accuracy of methods and laboratory tests.*

**Key words:** iron, reticulocyte, ferritin, creatinine, crp, anemia

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

## Kazalo

<b>1 UVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>2 TEORETIČNI DEL</b> .....	<b>13</b>
2.1 HEMATOLOGIJA.....	13
2.1.1 Rdeče krvne celice.....	13
2.1.2 Bele krvne celice .....	17
2.2 ŽELEZO.....	18
2.2.1 Absorpcija železa.....	18
2.2.2 Hepcidin .....	20
2.2.3 Vsebina telesnega železa.....	21
2.2.4 Železo v prehrani.....	21
2.3 BOLEZNI RDEČIH KRVNIH CELIC .....	22
2.3.1 Anemija.....	23
2.4 ANEMIJA ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA .....	25
2.4.1 Klinične značilnosti .....	25
2.4.2 Preiskave pri anemiji zaradi pomanjkanja železa.....	26
2.4.3 Izčrpavanje zaloga železa.....	30
2.4.4 Laboratorijske značilnosti anemije zaradi pomanjkanja železa .....	30
2.4.5 Diferencialne diagnoze.....	31
2.4.6 Zdravljenje .....	33
2.4.7 Parenteralna terapija z železom.....	35
2.5 ANEMIJA PRI KRONIČNI BOLEZNI.....	35
2.6 MIELODISPLASTIČNI SINDROM .....	36
2.6.1 Vrste mielodisplastičnih sindromov.....	36
2.6.2 Spremembe v krvi in kostnem mozgu pri mielodisplastičnem sindromu .....	37
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>38</b>
3.1 METODE IN PRINCIPI .....	38
3.2 KRVNI RAZMAZ (DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA) .....	40
3.2.1 Material.....	40
3.2.2 Postopek.....	41
3.3 HEMATOLOŠKI KAZALCI IN PRINCIPI.....	42
3.3.1 Določevanje koncentracije eritrocitov v krvi .....	42
3.3.2 Določevanje vrednosti hemoglobina v krvi.....	43
3.3.3 Določevanje MCV v krvi.....	43
3.4 ANALIZA RETIKULOCITOV .....	44
3.5 BIOKEMIJSKI KAZALCI IN PRINCIPI .....	45
3.5.1 Določevanje železa v krvnem serumu .....	45
3.5.2 Določevanje feritina v krvnem serumu.....	46
3.5.3 Določevanje kreatinina .....	46

3.5.4 Določevanje CRP-ja .....	47
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>48</b>
4.1 REZULTATI MERITEV, OPRAVLJENI PRI PACIENTIH Z ANEMIJO ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA.....	48
4.2 REZULTATI MERITEV, OPRAVLJENI PRI PACIENTIH Z REFRAKTORNO ANEMIJO.....	49
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>50</b>
5.1 VREDNOTENJE REZULTATOV.....	50
5.1.1 Vrednosti feritina .....	50
5.1.2 Vrednosti kreatinina.....	50
5.1.3 Vrednosti železa.....	51
5.1.4 Vrednosti retikulocitov .....	52
5.2 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	52
<b>6 SKLEP.....</b>	<b>56</b>
<b>7 UPORABLJENI VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>58</b>
<b>8 PRILOGE.....</b>	<b>61</b>
8.1 ŽIVLJENJEPIS.....	61



**Kazalo slik:**

SLIKA 2.1: RDEČE KRVNE CELICE .....	14
SLIKA 2.2: HEMOGLOBIN .....	15
SLIKA 2.3: HEM .....	15
SLIKA 2.4: BIOKEMIČNI KORAKI V FORMACIJI HEMA IN HEMOGLOBINA.....	17
SLIKA 2.5: BELA KRVNA CELICA.....	17
SLIKA 2.6: ŽELEZO- TRANSPORT, SHRANJEVANJE IN ASIMILACIJA V HEM .....	20
SLIKA 2.7: STRUKTURA HEPCIDINA .....	21
SLIKA 2.8: NIVO SERUMSKEGA FERITINA.....	28
SLIKA 2.9: RETIKUENDOTELIALNE CELICE ZALOG ŽELEZA .....	29
SLIKA 2.10: MORFOLOGIJA S POMANJKANJEM ŽELEZA.....	33

**Kazalo preglednic:**

PREGLEDNICA 2 - 1: NAHAJALIŠČA TELESNEGA ŽELEZA .....	21
PREGLEDNICA 2 - 2: VSEBNOST ŽELEZA (MG/100G) V DOLOČENIH ŽIVILIH .....	22
PREGLEDNICA 2 - 3: SIGNALI IN SIMPTOMI ANEMIJE .....	24
PREGLEDNICA 2 - 4: ETIOLOŠKA KLASIFIKACIJA ANEMIJE .....	24
PREGLEDNICA 2 - 5: VZROKI POMANJKANJA ŽELEZA .....	26
PREGLEDNICA 2 - 6: MERITVE ZALOG ŽELEZA .....	27
PREGLEDNICA 2 - 7: DIFERENCIALNE DIAGNOZE MIKROCITNE ANEMIJE .....	32
PREGLEDNICA 2 - 8: PREPARATI ŽELEZA PRI NAS .....	34

**UPORABLJENE KRATICE IN OKRAJŠAVE**

RBC	rdeče krvne celice
WBC	bele krvne celice
DNA	deoksiribonukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina
Co- A	koencim A
ALA	aminolevulinska kislina
Hb	hemoglobin
Fe	železo
ACD	anemija zaradi kronične bolezni
TfR	transferinski receptor
sTfR	topen transferinski receptor
MCV	glavni celični volumen
HAMP	hepcidin
SI	serumsko železo
TIBC	celotna kapaciteta vezave železa
ELISA	encimsko imunski test
Log	logaritem
RET	retikulociti
NRB	normoblasti
IMI	nezrele celice
H <sub>2</sub> O	voda
MCH	povprečna količina hemoglobina
MCHC	povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu
CRP	C- reaktivni protein

**GRŠKE ČRKE**

α	stopnja tveganja
---	------------------

**SIMBOLI**

fl	femtoliter
----	------------

## 1 UVOD

Mikrocitna anemija je skupno ime za tiste vrste slabokrvnosti, pri katerih je povprečni volumen eritrocitov manjši kot normalno. Normalne meje povprečnega volumna eritrocitov znašajo od 81-94 fl. Če imajo rdeče krvničke v povprečju volumen manjši od 81 fl, govorimo o mikrocitih. Pri mikrocitni anemiji so rdeče krvničke običajno hkrati tudi hipokromne, kar pomeni, da so bolj bledikave kot normalno. To pa je posledica pomanjkanja hemoglobina. (wikipedia)

Pri sumu na pomanjkanje železa zdravniki naročijo laboratorijski test, s katerim določajo serumsko železo. S testom se izmeri količina železa, ki kroži v plazmi, in je vezana na beljakovino transferin. Na splošno je 65 % železa vezanih na molekule hemoglobina v rdečih krvnih celicah, približno 4 % na molekule mioglobina, 30 % železa pa skladiščenih kot feritin ali hemosiderin v vranici, kostnem mozgu ali jetrih. Molekula transferin, na katero je vezano železo, se proizvaja v jetrih. Bistvenega pomena je predvsem, če se shranjeno železo porabi ali premesti. Približno 30 % razpoložljivih strani je na molekuli transferina večino časa zapoljenih. Test, ki meri delež transferina, na katerega se veže železo, je lahko pomožni klinični indikator, znan kot odstotek nasičenja transferina. Drugi test nasičenja, ki meri celotno količino transferina, se imenuje »sposobnost vezave celotnega železa« (TIBC). Lahko mu rečemo tudi kapaciteta krvi, ki veže železo s transferinom. Merimo maksimalno vrednost železa, ki ga lahko nosi in tako indirektno izmerimo vrednost transferina. Te teste navadno opravljamo hkrati in so pomemben del diagnostičnega procesa za stanje, kot je anemija zaradi pomanjkanja železa. Za ločevanje od anemije zaradi kroničnih bolezni je bistvenega pomena tudi koncentracija feritina. Pri teh proizvaja telo več feritina kot transferina, predvidoma zato, da drži železo stran od patogenov, ki so potrebni za metabolizem.

Namen diplomske naloge je bil preučiti krvne slike bolnikov s pomanjkanjem železa in kroničnih bolnikov ter oceniti natančnost metode določanja železa. Ob tem smo opravili tudi določitev retikulocitov in koncentracijo feritina, vnetne pokazatelje (CRP) in ledvične teste (kreatinin). Proučili smo laboratorijske izvide:

- Desetih bolnikov z diagnozo anemije zaradi pomanjkanja železa,
- Osmih bolnikov z diagnozo refraktorne anemije.

Na ta način smo ocenili, ali je določevanje serumskega železa dejansko pravilna metoda pri sumu na anemijo in ali ti bolniki potrebujejo zdravljenje z železom. S pomočjo teh ocen smo lahko tudi predvideli natančnost metode in laboratorijskih testov.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 HEMATOLOGIJA

Če bi želeli posplošiti ta izraz, lahko rečemo, da je hematologija študija krvi. Krvne celice se proizvajajo v kostnem tkivu in se sproščajo v periferno kri, ko dozori. Kri je dinamična tekočina, ki zagotavlja molekularni in celični transport ter ostale regulacijske funkcije. Kri je prisotna v vseh organih in v tkivu, prenaša pa esencialne substance, kot so kisik in ostala hranila do celic in odpadne produkte proč od celic, vse do izločil. Kot taka ima zelo pomembno vlogo v zagotavljanju ustrezne celote - telesne fiziologije in homeostaze.

Kri sestavlja približno 45% krvnih celic, ki so klasificirane v tri glavne skupine:

- rdeče krvne celice (RBC), katere preskrbujejo tkivo s kisikom,
- bele krvne celice (WBC), katerih prvotna funkcija je obramba pred infekcijami,
- trombociti, ki preprečujejo izgubo krvi v primeru poškodbe, v kombinaciji s posebnimi beljakovinami, ki tvorijo strdek.

Preostalih 55% krvi sestavlja plazma, ki je vodna raztopina s funkcijo transportnega medija za krvne celice, raztopljeni hranila in plazemske beljakovine, vključno s tistimi, ki so udeleženi v krvni koagulaciji.

Krvni test je izveden s celotno krvjo, plazmo ali serumom, odvisno od zahtevane raziskave. Kri zbiramo z venskimi punkcijami v posebno oblikovane posodice. Krvni testi, ki zahtevajo celotno kri ali plazmo, so zbrani v epruvete, ki vsebujejo antikoagulanse (preprečujejo strjevanje krvi pred opravljeno analizo), serum pa zbiramo v epruvete brez antikoagulansa. (Moore, Knight, Blann, 2010)

#### 2.1.1 Rdeče krvne celice

Rdeče krvničke ali eritrociti so krvne celice, ki oskrbujejo telo s kisikom. Velikost je približno 7-8  $\mu\text{m}$ , kar je veliko manj od ostalih človeških celic. So brez jedra in izpolnjene s hemoglobinom, ki prenaša kisik. Njihova življenska doba je dolga od 100 do 120 dni. (wikipedia)

Hematologi se zanimajo za število in funkcijo rdečih krvnih celic, njihovo obliko in količino ter kvaliteto hemoglobina, ki ga vsebujejo. Najpogostejše bolezensko stanje, ki zadeva rdeče krvne celice, je anemija. Najpogostejša posledica anemije je zmanjšan prenos kisika v krvi, kar vodi do kliničnih simptomov letargije, omotice, slabosti in slabega počutja. Če se anemija

slabša, lahko pacienti občutijo kratko sapo, glavobole, boleče dlesni in usta. (Moore, Knight, Blann, 2010)

Najpogostejši vzroki anemije so:

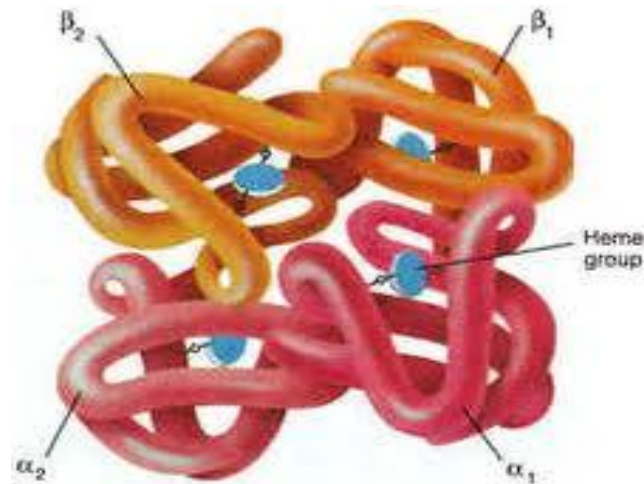
- pomanjkanje železa, kar vpliva na proizvodnjo hema,
- pomanjkanje vitamina B12 ali folata, kar vpliva na proizvodnjo DNA,
- druge bolezni, kot so malignosti, bolezni jeter ali ledvic, zastrupitve s kovinami in infekcije,
- akutna in kronična izguba krvi.



**Slika 2.1:** RDEČE KRVNE CELICE

## **Hemoglobin**

Hemoglobin je beljakovina, ki vsebuje železo, sintetizirana s celičnimi prekurzorji v kostnem tkivu, kot je eritroblast, ki na koncu pomaga pri rasti zrelih rdečih krvnih celic. Vsaka rdeča krvna celica vsebuje približno 640 milijonov molekul hemoglobina. Ta je zgrajen tako, da lahko absorbira kisik s področja z visoko vsebnostjo kisika (pljuča) in ga potem sprosti na področjih z nizko vsebnostjo kisika. Če poudarimo pomembnost transporta kisika, imenujemo molekule hemoglobina, ki prenašajo kisik - oksihemoglobin, in tiste, ki ne prenašajo kisika - deoksihemoglobin. Molekula hemoglobina je sestavljena iz dveh delov, kot sta beljakovinski del - globin in kompleksni nebeljakovinski del - hem. Slednji vsebuje tudi železo, kamor se pritrdi molekula kisika. (Moore, Knight, Blann, 2010)



**Slika 2.2:** HEMOGLOBIN

## Hem

Hem je kompleksna molekula, sintetizirana v citoplazmi in mitohondriju, v razvoju prekursorjev rdeče krvne celice (prvotno eritroblast in jedrne rdeče krvne celice). Številne od encimskih reakcij, ki vodijo do sinteze molekule hema, potrebujejo mikronutriente, ki jih zagotovimo s prehrano; tukaj je potrebno železo, vitamin B12, vitamin B6 in folati. Pomanjkanje železa je najbolj pogost problem v hematologiji, kar bomo v nadaljevanju podrobneje obravnavali. Pomanjkanje vitamina B6 je redko v odsotnosti določenih zdravil. Nekoliko pogosteje pa opazimo tudi pomanjkanje vitamina B12 in folatov. (Moore, Knight, Blann, 2010)



**Slika 2.3:** HEM

### **Sinteza hema**

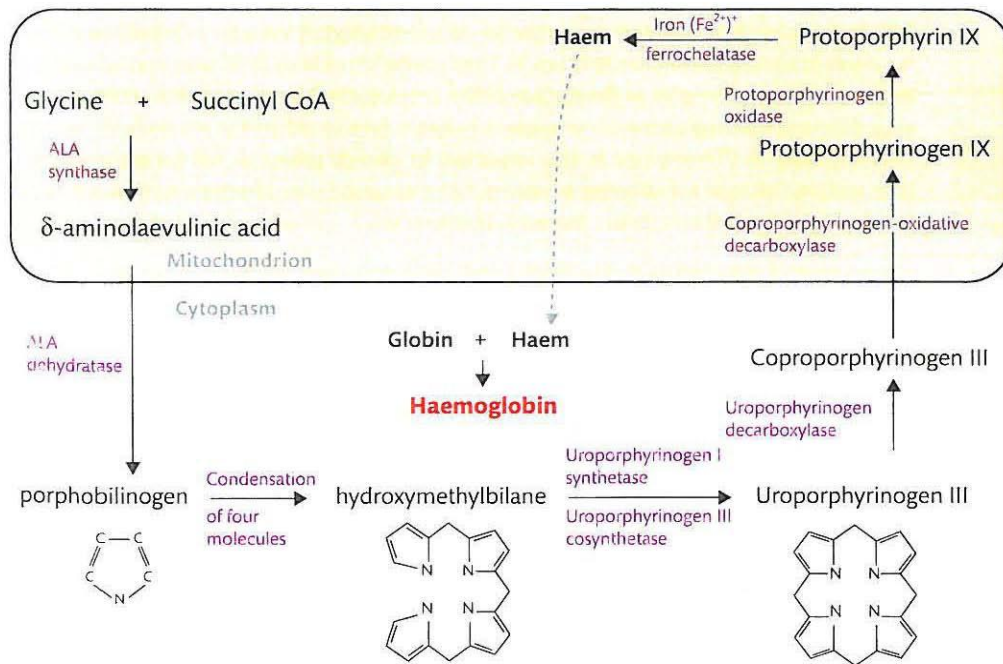
Prvi korak v formaciji hema je sinteza protoporfirinskega obroča. Začetni korak v mitohondriju zavzema tudi karboksilacijo propionil koencima A in tako se formira tudi metilmalonic- CoA, pogosto opisan kot metilmalonična kislina. Naslednji korak je izomerizacija, ki jo lahko vidimo v formaciji sukcinil- CoA. Encim, ki nadzoruje to reakcijo, metilmaloni- CoA mutaza, potrebuje vitamin B6 ali piridoksin kot kofaktor.

Sukcinil- CoA in glicin iz prehrane se pretvorita v pet-ogljikovo molekulo aminolevulinsko kislino (ALA) z encimom ALA sintazo. Ta encim potrebuje tudi eno izmed oblik vitamina B12 kot kofaktor. Nekoliko drugačna oblika vitamina B12 pa je potrebna za drugi pomemben metaboličen korak, kjer se pretvorita hemocistein in metil-tetrahidrofolat v tetrahidrofolat in metionin. Naslednji korak vsebuje serijo kompleksnih metabolnih intermediatov v citoplazmi. Dve molekuli levulinske kisline se dehidrirata in kondenzirata v obročno strukturo z ogljikom in z dušikovimi atomi in tako tvorita pirolno strukturo, imenovano porfobilinogen.

V naslednjem koraku so štiri molekule porfobilinogena združene, da lahko formirajo hidroksimetilbilan, v katerem je obročna struktura skoraj kompletna. Zaprtje tega obroča je kompletno s formacijo uroporfobilinogena. Pomemben korak je tudi pretvorba uroporfobilinogena 3 v koproporfobilinogen 3, ki se prestavi v mitohondrij in tam postane protoporfirinogen 4 in na koncu protoporfirin 4. Zadnji korak je aktivnost encima ferokelataze, ki nadzoruje vstavitve železovega atoma v protoporfirinski obroč in tako zgradi hem.

Sinteza protoporfirinskega obroča zahteva dva pomembna kofaktorja: vitamin B6 in vitamin B12. Pomanjkanje teh nutrientov se pozna v okvari pri zorenju rdečih krvnih celic, kot tudi pri drugih delih metabolizma. Tako so tudi okvare v drugih različnih encimih odgovorne za mnoge kompleksne poti metabolizma v sintezi hema in bodo tudi vodile do raznih bolezni rdečih krvnih celic, kot so sideroblastična anemija, megaloblastična anemija, porfirija idr. Hem pa ima tudi ostale pomembne vloge v metabolizmu: prisoten je v mioglobinu, v citokromu, v encimih katalaze in peroksidaze ter sodeluje pri metabolizmu triptofana. (Moore, Knight, Blann, 2010)



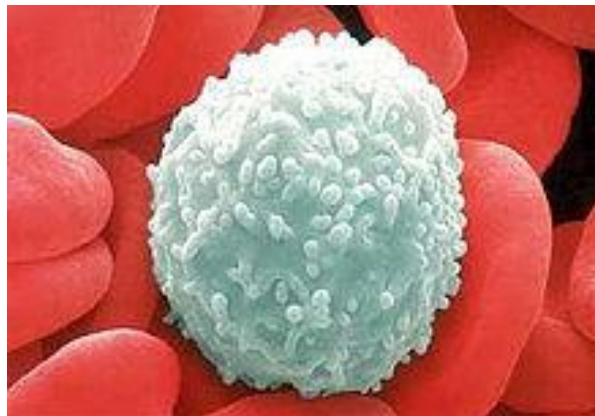


**Slika 2.4:** BIOKEMIČNI KORAKI V FORMACIJI HEMA IN HEMOGLOBINA

### 2.1.2 Bele krvne celice

Levkociti ali bele krvne celice, med katerimi je pet prepoznavnih tipov, so del imunskega odziva. Pomagajo ščititi telo pred različnimi infekcijami, ki jih povzročajo mikrobi, kot so virusi in bakterije. Najpogostejša resna bolezen belih krvnih celic je levkemija. Hematološki laboratorij raziskuje število vsakega tipa belih krvnih celic v periferni krvi in ali so te zrele ali ne. (Moore, Knight, Blann, 2010)

Levkociti se ločijo po obliki in funkciji. Mednje uvrščamo granulocite, monocite in limfocite. Med granulociti ločimo nevtrofilce, eozinofilce in bazofilce. Glede na funkcijo pa ločimo fagocite od imunocitov. (Bohinjec, 1983)



**Slika 2.5:** BELA KRVNA CELICA

## 2.2 Železo

Železo je sestavina vseh celic. V telesu se nahaja kot aktivno železo (encimi in Hb) in kot rezervno železo v raznih tkivih. Rezervno železo ima vlogo pri nastajanju novih eritrocitov in encimov, kadar obstaja povečana potreba po eritrocitih in encimih. Celotnega železa v telesu 70 kg težke osebe je približno 3-5 g. (Kocjančič, Mravlje, 1998)

Prav tako kot folate, vitamin B6 in B12, moramo tudi železo vnašati s prehrano. Absorpcija železa iz prehrane je približno 15 mg/dan, pri zdravem odraslem, in se vrši v dvanajstniku in jejunumu. Normalno se absorbira samo 5-10% železa, zaužitega s hrano. Hrana z najvišjo vsebnostjo tega minerala so jetra, meso, jajca in sušeno sadje. Železo, že v formaciji, v kateri se veže na hem, lahko najdemo v jetrih ali mesu kot dvovalentno železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in je absorbirano hitreje kot ostale oblike anorganskega železa, najdenega v zelenjavi. Tam je najpogosteje v obliki trivalentnega železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ). (Moore, Knight, Blann, 2010)

### 2.2.1 Absorpcija železa

Železo je esencialna komponenta sinteze hemoglobina, mioglobina in številnih hemskih ter metaloflavoproteinskih encimov. Direktno vlogo ima tudi pri urejanju eritropoeze, z vplivom na celični ciklus prekursorjev proliferajoče rdeče krvne celice. Padec zaloga železa v kostnem mozgu je povezan s padcem v proteinu ciklin D1 in s prijetjem eritroidnih prekursorjev v fazi G1/S, s čimer se poveča proliferajoč odgovor na eritropoetin.

Železo je v človeškem organizmu visoko ohranjeno. Še vedno pa se ga dovolj izgubi, da telo za ohranitev normalnega ravnovesja železa zahteva absorpcijo elementalnega železa iz prehrane nekje med 1 - 4 mg vsak dan. Črevesje tako pošlje odgovor na negativno ravnovesje železa s povečano učinkovitostjo transporta. Istočasno lahko črevesje skoraj ugasne transport, ko zaloge železa prerastejo zahteve metabolizma. (Moore, Knight, Blann, 2010)

Prosto železo se absorbira z epitelnimi celicami skozi specifično celično membrano (divalent metal transporter-1). Pretvorba trivalentnega v dvovalentno železo je olajšana zaradi encima feroreduktaze na površju enterocitov. Hem tako vstopa v celico skozi različne mehanizme, prisotnost železa v hemu pa je sproščena z intracelularnim encimom hemoksgenazo1. Ta encim je zelo pomemben pri recikliranju železa. Intracelularno železo lahko shranimo, toda večino ga podamo iz citoplazme do cirkulacije s pomočjo ferroportina. Gibanje železa v plazmo s ferroportinom je regulirano s peptidom hepcidin. Ta hormon kontrolira izražanje ferroportina, ki kontrolira izvoz železa iz črevesnih enterocitov, Kupferjevih celic, makrofagov, hepatocitov in placentarnih celic. Iz molekularnega nivoja, ko se hepcidin veže z

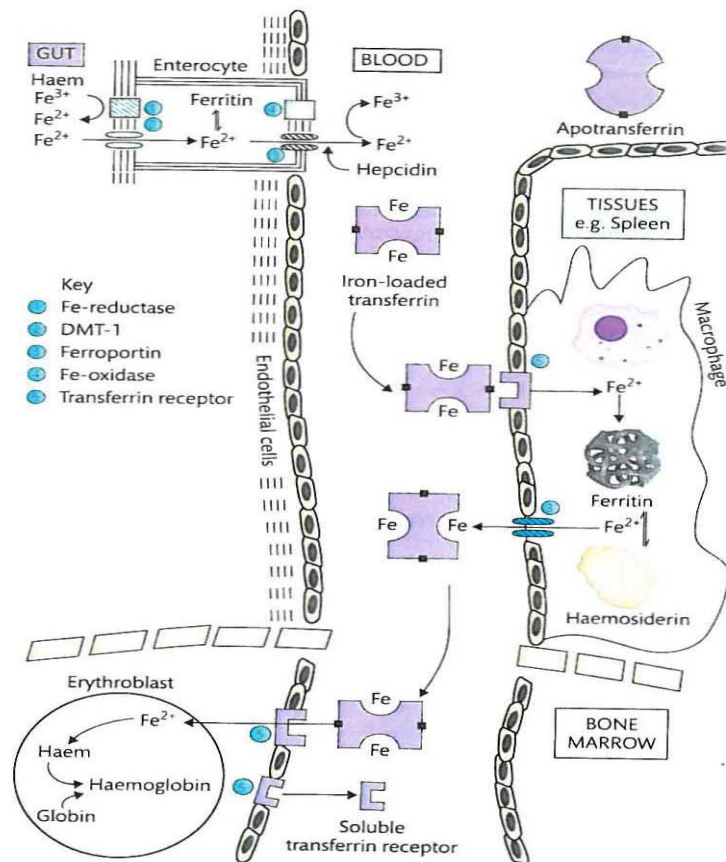
ekstracelularnim vidikom ferroportina, se ta internalizira in vgradi v lizosome. Posledica tega je, da se železo ne premakne iz celice in v krvni obtok. Hepcidin tudi regulira sprostitvev železa z makrofagov z inaktivacijo ferroportina. Ta regulacijski sistem nam pomaga obrazložiti, zakaj je raven absorpcije železa povezana z zahtevami eritropoeze (povečana absorpcija, ko je eritropoeza aktivna) in s količino shranjenega železa (povečana absorpcija, ko so zaloge prazne). Povečana koncentracija hepcidina je ključ v razvoju anemije zaradi kronične bolezni (ACD) in tako je tudi njena sinteza inducirana z bakterijsko infekcijo kot obrambnim mehanizmom.

Ko je enkrat v obtoku, se prosto železo zbere s črevesnih celic s pomočjo prenosnih beljakovin, ki so sintetizirane v jetrih (albumin, laktoferin in transferin). Čeprav enterociti raje absorbirajo železo v dvovalentni obliki, bi bil prenos bolj učinkovit v trivalentni obliki. Encim, ki vsebuje baker - ceruloplazmin in encim oksidaza z membransko vezanim železom, ki pretvori dvovalentno železo v trivalentno, pomagata temu transportu. Med najbolj pomembne prenosne beljakovine spada transferin in ta lahko prenaša dva atoma trivalentnega železa. Beljakovine brez železa imenujemo apotransferin in 1g apotransferina lahko prenaša 1,25 mg železa. Transferin pa dostavi železo do kostnega tkiva. Količina železa, prenesenega s transferinom, je lahko uporaben indikator za prikaz generalnega stanja železa v telesu. In tako bo nasičen je transferina z visokim nivojem železa stimuliralo sprostitvev hepcidina, ki bo po drugi strani zmanjšalo nivo železa, ki potuje iz črevesja v kri.

Kompleks železo-transferin lahko vstopi le v razvoju rdeče krvne celice (kot je eritroblast) z vezavo enega od transferinskih receptorjev na površje celice. Transferinski receptor (Tfr) se lahko odtrga s površja eritroblasta in vstopi v obtok, v tem stanju ga lahko opišemo kot topen transferinski receptor (sTfr). Transferinske receptorje najdemo tudi na makrofagih, hitro razvijajočih se celicah in na aktiviranih limfocitih.

V celici se dvovalentno železo sprostí iz transferinske molekule, da se lahko odzove na spremembo pH-ja, in kot rezultat se apotransferin vrne v plazme ter lahko tako potuje nazaj do črevesja, kjer zbere še več železa. Železo, ki ni usmerjeno direktno v jetra, lahko shranimo v drugih organih, kot so dvanajsternik, vranica in kostno tkivo v sodelovanju z beljakovinami feritin in hemosiderin. Apoferitin je oblika feritina, ki je brez železa in je velika okrogla molekula. Shrani lahko do 5000 atomov trivalentnega železa v centru sfere in tako se lahko masa feritina, napolnjenega z železom, poveča za 35%. Hemosiderin je oblikovan z združevanjem delno prebavljenega feritina in ga najdemo v makrofagih v kostnem mozgu, jetrih in vranici. Ostanek železa iz hemosiderina je počasen in zato je železo hemosiderinskega kompleksa predstavljeno kot dolgoročno shranjeno in ne more biti takoj dostopno. V tej obliki ga lahko zaznamo pod svetlim mikroskopom, z uporabo posebnega prusko modrega barvila. Večina železa v telesu (65%) je vezana na hemoglobin, vendar pa se pomemben delež (30%) veže na feritin in hemosiderin. Preostanek je v mioglobinu (oblika

globina, prisotna v mišicah), v encimih (kot citohrom in katalaza) in v kompleksu s transferinom. (Moore, Knight, Blann, 2010)



**Slika 2.6:** ŽELEZO- TRANSPORT, SHRANJEVANJE IN ASIMILACIJA V HEM

### 2.2.2 Hepcidin

Hepcidin (HAMP) je antimikrobičen peptid, bogat s cisteinom, proizveden v jetrih, kot odgovor na ravnovesje železa, zaloge kisika in nivo eritropoeze (eritropoetin). Igra glavno vlogo v urejanju absorpcije železa in recirkulaciji železa od retikuloendotelialnih celic. Znižan nivo hepcidina je viden pri pacientih z vnetimi anemijami ter izhaja iz absorpcije železa in sproščanja železa iz retikuloendotelialnih celic. Pomanjkanje železa zavira proizvodnjo hepcidina in zato poveča tudi absorpcijo železa in recirkulacijo shranjenega železa. (wikipedia)



**Slika 2.7:** STRUKTURA HEPCIDINA

### 2.2.3 Vsebina telesnega železa

**Preglednica 2 - 1:** Nahajališča telesnega železa (Moore, Knight, Blann, 2010)

	Odrasel moški (80 kg) (mg)	Odrasla ženska (60 kg) (mg)
<b>Hemoglobin</b>	2500	1700
<b>Mioglobin in encimi</b>	500	300
<b>Serumsko železo</b>	3	3
<b>Zaloge železa</b>	500-1000	0-200

### 2.2.4 Železo v prehrani

Vsebnost železa v prehrani je odvisna od tipa zaužite hrane in od celotnega dnevnega vnosa kalorij. Železo, pridobljeno z mesom, je precej dostopnejše za absorpcijo. Čeprav naredimo visok dnevni vnos, je nehemsko rastlinsko železo veliko manj biološko. Sestavine v rastlinah, posebej fosfati in fitati, zavirajo absorpcijo železa do želene stopnje. V razvitih državah, kjer prehrana vsebuje ravnovesje mesa in zelenjave, vsebuje le ta približno 6 mg železa / 1000 zaužitih kalorij. Odrasel moški prebavi približno 15-20 mg železa vsak dan, ženska pa 10-15 mg na dan.

Tako imajo moški in ženske brez menstruacije zelo malo težav z uravnavanjem ravnovesja železa v telesu. Ženske z menstruacijo, hitro rastoči dojenčki, otroci in mladostniki ter ljudje, ki pogosto darujejo kri, pa lahko tvegajo izčrpanost zalog železa in potrebujejo dopolnila, da lahko obdržijo ravnovesje železa v telesu. Skoraj vedno pa so dopolnila železa zaželena v času nosečnosti. Dnevna potreba po železu zraste v zadnjih dveh trimesečjih za 5-6 mg, to

je nivo, ki ga težko obdržimo samo s prehrano, razen če je ta izjemno bogata s hemskim železom. (Moore, Knight, Blann, 2010)

**Preglednica 2 - 2:** Vsebnost železa (mg/100g) v določenih živilih (Krajnc I. in Pečovnik Balon, 2000)

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
rdeči 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

### **2.3 BOLEZNI RDEČIH KRVNIH CELIC**

Zmanjšano število rdečih krvnih celic ali nizek nivo hemoglobina generalno vodi do anemije. Redkeje opazimo obratno stanje, visok nivo rdečih krvnih celic in hemoglobina, vendar tudi to stanje vodi do bolezni. (Moore, Knight, Blann, 2010)

### 2.3.1 Anemija

Anemija je bolezensko stanje, kjer je zmanjšana celotna masa eritrocitov v krvnem obtoku. Slednjo v praksi ocenimo iz koncentracije hemoglobina v krvni sliki. Pri nekaterih akutnih stanjih, kot sta krvavitev ali dehidracija, pa koncentracija hemoglobina ne odseva dejanskih sprememb celotne količine hemoglobina oz. eritrocitov. (Černelč P., Opredelitev anemije)

Anemijo lahko opišemo kot patološko stanje rdeče krvne celice. Pri njeni definiciji prihaja do zelo deljenih mnenj. Ena izmed teorij definira anemijo kot stanje pri odraslem človeku, kjer je nivo hemoglobina v rdečih krvnih celicah nižji kot 14 g/dL pri moškem in nižji kot 12 g/dL pri ženski, druga teorija pa pravi, da mora biti ta nivo pri moškem nižji kot 13,5 g/dL in pri ženski nižji kot 11,5 g/dL. Svetovna zdravstvena organizacija povzema oboje in definira stanje anemije nižje kot 13 g/dL pri moškem in 12 g/dL pri ženski (11 g/dL v nosečnosti). Nekateri karakterizirajo bolezen kot nenormalitete v rdeči krvni celici in skupaj so to simptomi, ki potrebujejo zdravljenje - definicija, ki ne opredeljuje nivoja hemoglobina ali spola osebe. Tako nekdo, ki ima nivo hemoglobina nižji kot 9 g/dL, ne bi bil nujno anemičen.

Pomembno je poudariti, da mora biti praktikant pozoren na lokalne referenčne razrede, ki so lahko različne ne samo v realnih vrednostih, ampak tudi v enotah hemoglobina. Mnogo laboratorijev se opredeljuje k opisovanju in merjenju hemoglobina v g/L, namesto v g/dL, kot je bilo omenjeno prej.

Prepoznavanje in obvladovanje anemije je zahtevno predvsem zaradi različnih signalov in simptomov pri posameznikih, le redki od teh so popolnoma občutljivi ali specifični, da bi lahko bili zanesljivi tudi v praksi. Razširjeno razumevanje anemije je slabo tudi zaradi različnih metod klasifikacije, različnih podtipov v tem stanju, kot so nekateri na osnovi velikosti rdeče krvne celice (glavni celični volumen, MCV), drugi pa na osnovi stanja kostnega tkiva. Primer: v kolikor gre za anemijo in so rdeče krvne celice majhne (MCV je nizek, morda 70fL), potem lahko anemijo opišemo kot **mikrocitno**, če pa so te normalne velikosti, jo lahko opišemo kot **normocitno**.

Drugi klasifikacijski sistem se osredotoča na klinične signale in simptome, tretji na genetsko obravnavo. Sistem, ki ga bom predstavila, pa se nanaša na etiologijo, ki opisuje, kako je prišlo do takšnega stanja.

Največjega pomena pri tej metodi so kostno tkivo, problemi z mikronutrienti (kot je železo, vitamin B12, folna kislina), hemoglobin, celična membrana in metabolni encimi. (Moore, Knight, Blann, 2010)



**Preglednica 2 - 3:** Signali in simptomi anemije (Moore, Knight, Blann, 2010)

Signali	<p>Bledica</p> <p>Tahikardija (pulz se dvigne nad 100 utripov na minuto)</p> <p>Glositis (boleče požiranje in jezik- odgovoren za pomanjkanje vitamina B12)</p> <p>Koilonychia (žličasti nohti - odgovorna za pomanjkanje železa)</p> <p>Temen urin (hemolitična anemija)</p>
Simptomi	<p>Zmanjšana delovna sposobnost</p> <p>Utrujenost, zaspanost</p> <p>Oslabljenost</p> <p>Omedlevica</p> <p>Palpitacija</p> <p>Kratka sapa (posebej pri naporu)</p> <p>Redko: glavoboli, motnje okusa, tinitus</p>
Resnejše bolezni	<p>Zlatenica</p> <p>Splenomegalija</p> <p>Hepatomegalija</p> <p>Angina</p> <p>Poškodbe srca</p> <p>Povišana temperatura</p>

**Preglednica 2 - 4:** Etiološka klasifikacija anemije (Moore, Knight, Blann, 2010)

Kostno tkivo	<p>Supresija</p> <p>Infiltracija</p>
Problemi z železom	<p>Pomanjkanje v kostnem tkivu</p> <p>Presežna absorpcija</p> <p>Nepravilna vključitev v hem</p>
Pomanjkanje vitaminov	<p>Vitamin B12</p> <p>Folna kislina</p>
Anemija, povezana z boleznimi in drugimi organi	<p>Jetra</p> <p>Ledvice</p>



	Reprodukativni organi Vezivno tkivo Ščitnica
Hemoliza	Zaradi protiteles Zaradi zdravil Vnetja
Anemija zaradi genskih mutacij	Hemoglobinopatija Poškodbe membrane Poškodbe encimov

## 2.4 Anemija zaradi pomanjkanja železa

V tem poglavju bom predstavila posledice pomanjkanja železa in se dotaknila tudi njegovega presežka. Esencialni mikronutrienti železa, vitamin B12, vitamin B6 in folna kislina so potrebni v različnih pogledih človeške fiziologije, vključno s hemopoezo. Te nutriende dobimo večinoma s pravilno prehrano, tako da bi neustrezna prehrana utegnila povzročiti različne tipe anemij. Kakorkoli, tudi uživanje ustrezne prehrane lahko vodi do bolezni: neuspešna absorbcija esencialnih nutrientov - malabsorpcija.

Vsaka molekula hemoglobina potrebuje atom železa, na katerega se lahko veže kisik in se tako prenaša od pljuč do tkiva. Pomanjkanje železa tako vodi tudi do neparnega prenosa kisika. In tako je anemija zaradi pomanjkanja železa najpogostejša oblika anemij na svetu. Svetovna zdravstvena organizacija poroča, da je približno 30% celotne svetovne populacije anemične in v tej skupini je najpogostejša anemija zaradi pomanjkanja železa, ki nastane zaradi nezadostne dostave železa do kostnega tkiva. Najpogostejši vzrok za ta pojav je slaba, neustrezna prehrana. Pogoste so tudi druge, z železom povezane bolezni, kot so sideroplastna anemija in preobremenitev z železom. (Moore, Knight, Blann, 2010)

### 2.4.1 Klinične značilnosti

Med splošne znake anemije prištevamo slabost, utrujenost, blede kožo, hitro bitje srca, utrujenost pri delu, glavobol, kratko sapo, vrtoglavice, otrplost. Znaki so odvisni od starosti bolnika in stopnje anemije. Večkrat se razvijejo vidne spremembe v obnašanju, imenovane 'pica' sindrom. To lahko opazimo po bolnikovi želji po neobičajni hrani kot je led, kreda, karton. (Anemija, svetovni splet)

Zaradi pomanjkanja železa trpijo predvsem celice, ki vsebujejo železo vsebujoče encime. Zaradi prizadetosti celic perifernega živčevja se pojavijo parestezije, pride do prizadetosti celic od ust do prebavnega trakta, od ust do dvanajstnika. Pojavijo se ragade ob ustnih kotih (angularna heiloza), atrofija mukoze jezika in zgornjega prebavnega trakta, disfagija (Plummer-Vinsonov sindrom), pa tudi nastanek sploščenih ali vdolbenih nohtov (koilonychia) pripisujejo istemu mehanizmu.

Pri težji anemiji ob pregledu izstopa tipična bledica kože in vidnih sluznic, kar pa je očitno šele, ko hemoglobin pade pod 90 g/l. Najlažje opazimo bledico na ustnicah, veznicah, na dlaneh in ob nohtih. Srčni utrip je pospešen, slišen je sistolični 'anemični' šum nad celotnim srcem. Nikoli pa ne smemo pozabiti, da so to le vidni simptomi anemije in da je potrebno pacienta v celoti pregledati. (Glaser M., Borin P., Grmek Zemljič T., Anemija zaradi pomanjkanja železa)

**Preglednica 2 - 5:** Vzroki pomanjkanja železa

<b>Izčrpavanje shranjenega železa</b>	<b>Spremenjena eritropoeza zaradi pomanjkanja železa</b>	<b>Anemija zaradi pomanjkanja železa</b>
Neustrezna prehrana	Močnejše menstruacije	Kronična izguba krvi
Hitra rast	Nosečnost	Varice
Dojenje	Malabsorpcija	Bolezen peptične razje
Normalne menstruacije	Akutna krvavitev	Veliki črevesni tumorji
Darovanje krvi	Gastrektomija	Divertikulitis
	Regionalni enteritis	Angiodysplasia
	Vnetja	Intravaskularna hemoliza
	Akutte infekcije	Resna malabsorpcija
	Kronična vnetna stanja	Postgastrektomija
	Policitemija, zdravljena z plebotomijo	Regionalni enteritis

#### 2.4.2 Preiskave pri anemiji zaradi pomanjkanja železa

Točne diagnoze statusa pomanjkanja železa zahtevajo različne laboratorijske teste. Meritve serumskega železa, kapacitete z železom vezanega transferina, nivoja serumskega feritina imajo bistven pomen in so navadno zadostne, da lahko določimo diagnozo. Druge meritve običajno vključujejo direktno merjenje retikuloendotelialne zaloge železa v mozgu, uporabo

aspiracije mozga in meritev protoporfinskega nivoja rdečih celic ter razmerja sTfR s feritinom. (Moore, Knight, Blann, 2010)

### **A. Določevanje serumskega železa**

Serumsko železo (SI) je merjeno neposredno iz količine železa, vezanega na transferin. Normalen posameznik ima SI med 11-28 mmol/L. Celotna kapaciteta vezave železa (TIBC) je merjena iz količine železa, ki je lahko vezana na transferin in zato so potrebna nadomestna merjenja nivoja serumskega transferina. Normalni TIBC je med 50-75 mmol/L. SI in TIBC sta uporabljena, da izračunata odstotek nasičenja transferina z železom ( $SI/TIBC = \text{procent nasičenja}$ ). Pri normalnem ravnovesju železa je odstotek nasičenja med 20 % in 50%. Ko ta pade pod 20%, nastane problem v eritroidnem mozgu z ohranitvijo zadostne količine železa, da lahko s tem podpira povišan nivo eritropoeze. Ko pa je ta odstotek nad 50 ali 60%, poraste pošiljka železa do parenhimalnega tkiva in kot rezultat se začne železo nalagati na hepatocite, srčno mišico in hipofizo. (Moore, Knight, Blann, 2010)

### **B. Serumski feritin**

Feritin je protein, ki sodeluje v homeostazi železa. Serumski feritin, ki se odraža na velikosti zalog železa, je označen kot marker pri ocenjevanju statusa železa v odsotnosti vnetij. (Vloga serumskega transferinskega receptorja pri diagnozi pomanjkanja železa, haematologica.org)

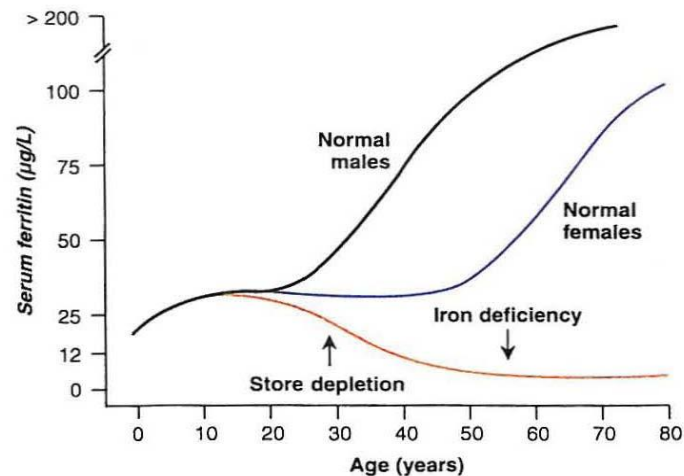
Serumski feritin navadno uporabljamo za vrednotenje celotnega shranjenega železa v telesu. Normalen odrasel moški ima nivo feritina med 50-200  $\mu\text{g/L}$ . To se sklada z 800-1.000 mg ali več vidnega tkiva zalog železa pri moškem. Ko se zaloge železa osiromašijo, se serumski feritin zniža in na koncu, ko so zaloge izčrpane, se pojavi eritropoeza zaradi pomanjkanja železa, nivo feritina pa pod 15  $\mu\text{g/L}$ . V statusu prenasičenja z železom lahko serumski feritin doseže nivo številnih tisočih mikrogramov. (Moore, Knight, Blann, 2010)

Nižja kot je koncentracija feritina v telesu, večja je verjetnost, da osebi primanjkuje železa. Največ feritina je v ledvicah, vranici in kostnem mozgu. (wikipedia)

**Preglednica 2 - 6:** Meritve zalog železa (Moore, Knight, Blann, 2010)

Zaloge železa	Serumski feritin( $\mu\text{g/L}$ )	Obarvanje železa na mozgu (0-4+)
0	<15	0
1-300mg	15-20	1+
300-800mg	20-50	2+

800-1.000mg	50-150	3+
>1-2g	150-300	4+
Prenasičenje železa	>500	4+ ali več



Slika 2.8: NIVO SERUMSKEGA FERITINA

### C. Serumski transferinski receptor

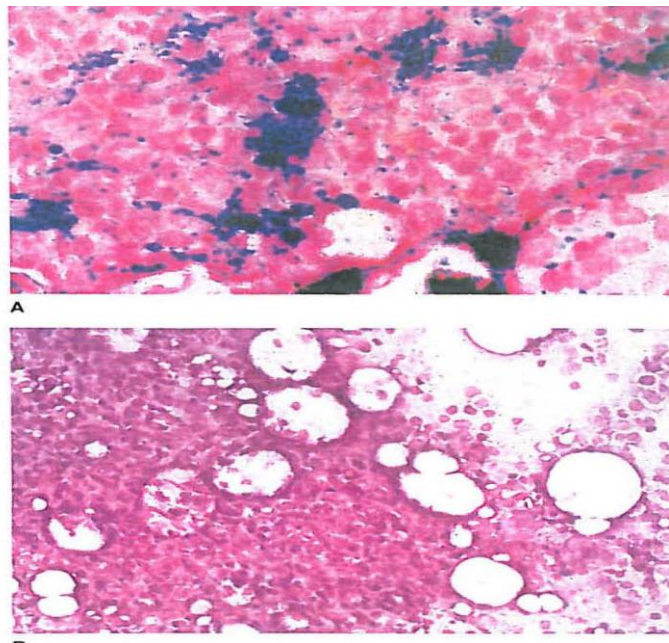
Encimsko imunski test (ELISA) za serumski transferinski receptor (sTfR) lahko uporabimo v povezavi z meritvami serumskega feritina v merjenju izčrpavanja zalog železa in okvar v dostavi železa do mozga. Sproščanje železa iz zalog se tako velikokrat pokaže z vnetjem. Nivo sTfR (normalen je 5-9 µg/L) se poveča takoj, ko so zaloge železa izčrpane (serumski feritin je manjši od 40 µg/L). Anemija zaradi pomanjkanja železa je zato povezana s povišanjem sTfR, sorazmerno z zahtevnostjo anemije. Kakorkoli, nivo sTfR se poveča tudi v povezavi s proliferacijo eritroidnih prekurzorjev, ne glede na to, ali je eritropoeza učinkovita ali neefektivna, kot tudi pri nekaterih pacientih z mieloproliferativno ali limfoproliferativno boleznijo. Pacienti z vnetnimi anemijami (anemije kronične bolezni) imajo nivo sTfR povsem približan normalnemu, kar se odraža na normalni ali rahlo povišani retikuloendotelialni zalogi železa in hipoproliferativnem eritroidnem mozgu. (Moore, Knight, Blann, 2010)

Številne študije dokazujejo porast sTfR pri anemijah zaradi pomanjkanja železa in pomanjkanje vpliva na vnetne spremembe. (Vloga serumskega transferinskega receptorja pri diagnozi pomanjkanja železa, haematologica.org)

### **D. Zaloge železa v kostnem mozgu**

Prisotnost zalog železa v retikuloendotelialnih celicah lahko določimo s pomočjo obarvanja delcev mozga s prusko modrim barvilom. Preprosta skala 0-4+ je bila ustvarjena, da oceni zalogo železa. Ta razvrščevalni sistem se dokaj dobro poveže s količino železa, ki je na voljo za eritropoezo. Je zelo zanesljiv postopek za določanje popolne odsotnosti retikuloendotelialnih zalog železa pri pacientih z anemijo zaradi pomanjkanja železa. Istočasno pa nam ne zagotavlja dobrih meritev celotnega tkiva, ki se nalaga kot nivo serumskega feritina.

Obarvanje železa v mozgu uporabljamo za določanje eritroidnih prekursorjev. 40-60% normalno razvijajočih se prekursorjev rdečih krvnih celic ima vidne, prahu podobne granule železa v svoji citoplazmi, ki predstavljajo presežek železa, neporabljenega pri proizvodnji hemoglobina. Te celice lahko označimo kot sideroplast. (Moore, Knight, Blann, 2010)



**Slika 2.9:** RETIKUENDOTELIALNE CELICE ZALOG ŽELEZA: (A) VIDNO OBARVANJE S PRUSKO MODRIM BARVILOM NA RETIKUENDOTELIALNIH CELICAH, (B) PACIENT S POMANJKANJEM ŽELEZA NE KAŽE OBARVANIH ZALOG.

### **E. Eritrocitni protoporfirin**

Meritve eritrocita protoporfirina lahko uporabimo tudi za odkrivanje zgodnje anemije zaradi pomanjkanja železa. Intracelularni nivo protoporfirina se bo povečal, še preden bo anemija prisotna. Ta proces je rezultat neravnovesja med zalogami železa in proizvodnjo protoporfirina v mitohondriju. Posebej uporaben je za prepoznavanje eritropoeze zaradi pomanjkanja železa pri otrocih, saj test zahteva le majhno količino odvzete krvi. Razmerje med protoporfirinom in hemom lahko izmerimo dokaj hitro s prenosnim hematofluorometrom. Povprečje protoporfirina rdečih krvnih celic je 30  $\mu\text{g/dL}$ . Nivo raste zelo hitro, vse do

vrednosti, ki presega 100 µg/dL pri anemiji zaradi pomanjkanja železa. Povišan nivo pa lahko opazimo pri otrocih, ki so izpostavljeni kovinam, ki zavirajo sintezo hema, kjer je potreben encim za končno sestavljanje železa in protoporfirinskega obroča, ki sestavlja hem. Lažno povišane vrednosti lahko opazimo pri pacientih s povišanim nivojem bilirubina ali pri hemodializi. (Moore, Knight, Blann, 2010)

### ***F. Vsebina retikulocitnega hemoglobina***

Ker sta glavni celični volumen (MCV) in glavni celični hemoglobin (MCH) neobčutljiva parametra na pomanjkanje železa zaradi počasnega prometa pri kroženju rdečih krvnih celic, hemoglobin z vsebnostjo retikulocitov (CHr) upada v nekaj dneh z nastopom eritropoeze zaradi pomanjkanja železa. Vendar pa CHr, uporabljen v presejalnem testu, nima posebnosti in tako obstaja samo en avtomatični števec, ki lahko opravi to meritev (Bayer Advia).

Diagnoza stanja pomanjkanja železa je v veliki meri laboratorijska vaja. Če povzamemo, se lahko izčrpanje zalog železa, eritropoeza zaradi pomanjkanja železa in anemija zaradi pomanjkanja železa med seboj razlikujejo v kombinaciji meritev hemoglobina, morfologije rdeče krvne celice, SI, TIBC, serumskega feritina serumskega TfR in zalog železa v mozgu. (Moore, Knight, Blann, 2010)

#### **2.4.3 Izčrpavanje zalog železa**

Izčrpavanje zalog železa najboljše ocenimo z določevanjem serumskega feritina ali z obarvanjem železa s prusko modrim barvilom pri delcih mozga. Nivo serumskega feritina (nižji kot 40µg/L) ali vidne zaloge železa (< 200-300 mg) kažejo na izčrpanje zalog železa. Razmerje sTfR/feritin je še bolj občutljiv indikator celotnega železa v telesu in ga uporabljamo pri ocenjevanju populacije pri tveganju za pomanjkanje železa. Pri odsotnosti zapletov vnetnih bolezni bo začelo to razmerje rasti, dokler serumski feritin ne pade pod 40µg/L. V nasprotju bo, dokler so zaloge železa prisotne, nivo SI, TIBC in hemoglobina normalen. (Moore, Knight, Blann, 2010)

#### **2.4.4 Laboratorijske značilnosti anemije zaradi pomanjkanja železa**

Anemijo v polnem »razcvetu« je enostavno prepoznati. Nivo Si-ja je izjemno nizek in nivo TIBC-ja je visok ter predstavlja odstotek nasičenja, nižji od 10%. Nivo serumskega feritina je

vedno nižji kot  $15\mu\text{g/L}$ , nivo sTfR se dvigne (kot pri razmerju sTfR/feritin) in pregled delcev mozga razkriva odsotnost zalog železa in odsotnost sideroplastov. Pacientom z resnim pomanjkanjem železa pripišemo zmerno do resno anemijo in značilne spremembe pri morfologiji rdeče krvne celice. Ko nivo hemoglobina pade pod  $10\text{-}11\text{ g/dL}$ , stimulacija eritropoetina v mozgu prisili proizvodnjo celic, ki so morfološko nenormalne. Sprva so celice mikrocitne, brez nenormalnosti v celični obliki ali vsebini hemoglobina. S slabšanjem anemije pa postajajo nove rdeče krvne celice bolj mikrocitne in hipokromične. Medtem ko je nivo hemoglobina v razredu od  $9\text{-}11\text{ g/dL}$ , je zmanjšanje v celični velikosti približno enako izgubi celic hemoglobina, tako da bi naj celice bile enakomerno mikrocitne z malo ali brez hipokromije. Obstajajo tudi zmerne različice v celični velikosti (anizocitoza) in celični obliki (poikilocitoza). Ko pade hemoglobin pod  $9\text{ g/dL}$ , postane morfologija celice zelo čudna, s pojavom raznih nepravilni oblik (poikilociti). Ta situacija je znak večanja neefektivnosti eritropoeze, v odgovor na visok nivo stimulacije eritropoetina. Tukaj lahko tudi ugotovljamo prisotnost ali odsotnost cigarnih ali koničastih rdečih krvnih ter tarčnih celic, katere pomagajo pri ločevanju in prepoznavanju anemije. Cigarno oblikovane celice so tako značilne za anemijo zaradi pomanjkanja železa, tarčne celice pa povezujemo s talasemijo.

Določanje vzroka za izgubo železa je bistveno pri diagnozi katerekoli anemije zaradi pomanjkanja železa. Če ni prisotne bistvene lastnosti zunanje izgube krvi, je potrebna polna ocena prebavnega trakta, ki bi kazala na krvavitev.

Neizrazita narava ravnovesja železa pri dojenčkih, hitro rastočih mladostnikih in nosečnicah običajno oteži delo in raziskave. Pri teh primerih je pomemben terapevtski pristop in dopolnila železa.

Razen tega pa tudi najmilejših pomanjkanj železa pri moških in ženskah po menopavzi ne bi smeli jemati kot preprosto neravnovesje železa in zdraviti kar takoj z dopolnili železa. (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

### 2.4.5 Diferencialne diagnoze

Obstajajo bolezni, ki jih lahko primerjamo in upoštevamo kot diferencialne diagnoze mikrocitne, hipokromične anemije. Prirojene napake v proizvodnji globina (talasemija) običajno ustrezajo številnim mikrocitozam z raznimi stopnjami anemije. Če sta prisotna oba pogoja hkrati (enotnost oblik rdečih krvnih celic, prisotnost tarčnih ali cigarno oblikovanih celic), bomo zlahka ločili med talasemijo in anemijo.

Bolj pogost je problem ločevanja eritropoeze zaradi pomanjkanja železa, sekundarno zaradi izgube železa, od izgube železa zaradi spremljajočih akutnih in kroničnih vnetij. Pri vnetnih procesih je motena normalna recirkulacija železa od retikuloendotelialnih celic do



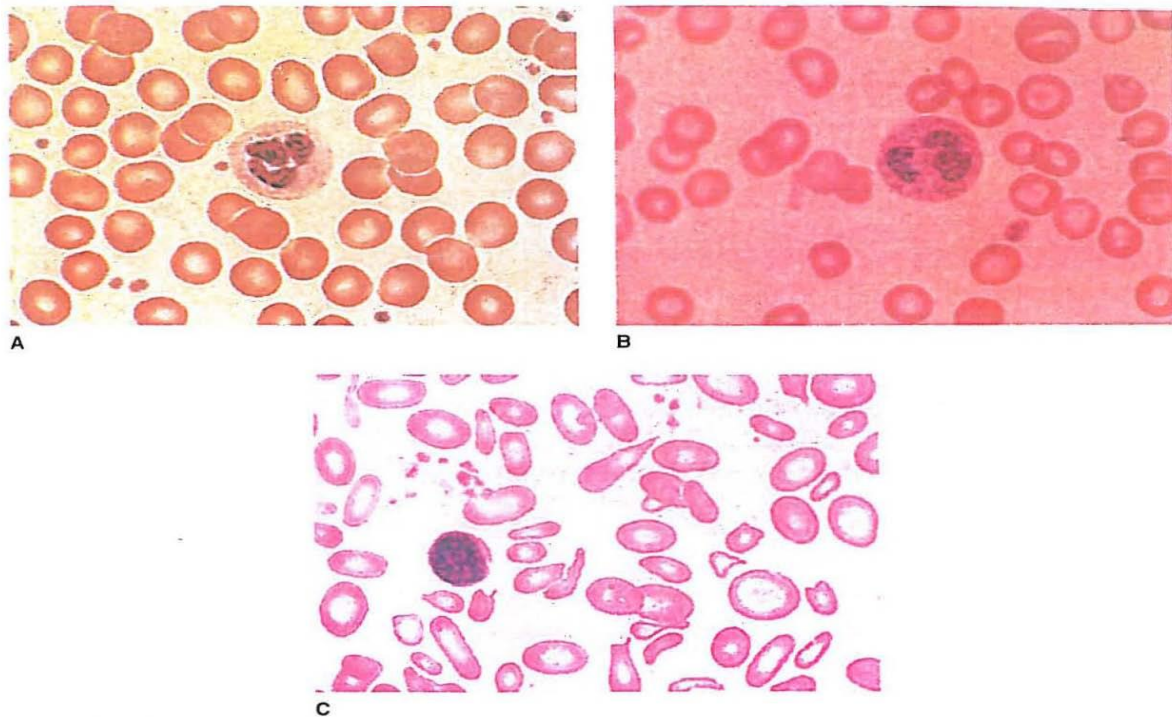
prekursorjev eritroida. Ko pade serumsko železo na manj kot 50 µg/dL, začne število sideroblastov v mozgu upadati in proizvodnja rdeče krvne celice je zatrta. Kot rezultat akutnih vnetnih bolezni je anemija zelo blaga (hemoglobin <10 g/dL) in morfologija rdeče krvne celice neprizadeta. Z dolgo trajajočimi kroničnimi vnetnimi boleznimi, kot je revmatoidni artritis, pa lahko prizadete zaloge železa vplivajo na zmerno resne oblike mikrocitne/hipokromične anemije.

Študije železa običajno pokažejo razlike med pravim pomanjkanjem železa, vnetnimi zastoji v dostavi železa (anemija zaradi kroničnih bolezni) in talasemijo. Vzorec z nizkim serumskim železom, visokim TIBC (procent nasičenja > 10%), nizkim nivojem feritina, povečanim razmerjem serumskega TfR/ feritin in z odsotnostjo zalog železa je značilen za pravo pomanjkanje železa. Kljub temu pa imajo tudi pacienti z vnetnimi anemijami nizek nivo serumskega železa in nizek procent nasičenja s transferinom, zaloge železa bodo še vedno vidne v mozgu in bo njihov serumski feritin normalen ali rahlo povišan. Pacienti z manjšo talasemijo pa lahko imajo skoraj normalen profil železa. Številne redke genetske okvare lahko povzročijo eritropoezo zaradi pomanjkanja železa, vključno z mutacijami v reguliranih genih DMT1, proizvodnjo feroportina, ceruloplazmina, hepcidina, transferina in aktivnost feroksidaze, potrebne za mobilizacijo zalog železa. Mikrocitoza lahko pri pacientih s prirojenimi ali pridobljenimi napakami v mitohondrijski funkciji povzroči tako imenovano sideroblastično anemijo. (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

**Preglednica 2 - 7:** Diferencialne diagnoze mikrocitne anemije (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

	<b>TALASEMIJA</b>	<b>POMANJKANJE ŽELEZA</b>	<b>KRONIČNA VNETJA</b>
<b>SI</b>	Normalna/povečana	Nizko	Nizko
<b>TIBC</b>	Normalen	Visok	Nizek
<b>% nasičenja</b>	>10	<10	10-20
<b>Serumski transferinski receptor (sTfR)</b>	Povečan	Povečan	Normalen
<b>Feritin (µg/L)</b>	>50	<15	30-200
<b>Log (sTfR/feritin)</b>	>2,5	>2,5	<2,5
<b>Zaloge železa</b>	3-4+	0	1-4+





**Slika 2.10:** MORFOLOGIJA S POMANJKANJEM ŽELEZA. BRIS PACIENTA S POMANJKANJEM ŽELEZA JE LAHKO NORMOCITEN ALI NORMOHROMEN. (A) RAHLO MIKROCITNA Z MINIMALNO HIPOHROMIJO, (B) MIKROCITNA IN HIPOHROMIČNA, (C) PREMER RDEČIH KRVNIH CELIC JE POVEČAN, OZNAČENO PA JE POMANJKANJE INTRACELULARNEGA HEMOGLOBINA.

#### 2.4.6 Zdravljenje

Vedno je pomembno poznati vzrok za pomanjkanje železa, preden se lotimo zdravljenja. Pri kronični izgubi krvi moramo kontrolirati, ali bo terapija z železom učinkovita.

Če je prisotna prebavna malabsorpcija, mora biti pot absorpcije železa modificirana. Pri pacientu bi morali preveriti tudi prisotnost kakršnihkoli vnetnih bolezni ali predhodnih problemov z netoleranco oralnih železovih preparatov, saj komplicirane vnetne bolezni preprečujejo absorpcijo železa in sprostitve železa z retikuloendotelialnih celic. Vsa ta preverjanja in zaključki imajo pomemben vpliv pri določanju zdravljenja. (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

## Zdravljenje z železovi preparati

Transfuzije koncentriranih eritrocitov pri teh vrstah anemije običajno niso potrebne. Izjema so le anemije, pri katerih se HB spusti pod 70 g/l. (Glaser M., Borin P., Grmek Zemljič T., Anemija zaradi pomanjkanja železa)

Številni preparati železa so dosegljivi v obliki tablet ali kapsul. Tablete železovega sulfata so najmanj drage in zato najbolj prodani preparati. Železov fumarat, železov glukonat in kompleks polisaharid (železo v obliki tablet) so ekvivalentni preparati, vsebina pravega železa je sicer nekoliko drugačna. Karbonil železo je približno 70 % bolj učinkovito kot železov sulfat. Kakorkoli, pacienti bodo zaradi njegove počasne črevesne sprostitve železa bolje tolerirali karbonil železo. Če katerega od teh pripravkov uživamo 3-4 krat dnevno pred obroki, se med 40-60 mg železa absorbira in dostavi do eritroidnega mozga. Ta proces bo podprl proizvodnjo mozga do 3 krat bolj kot normalno pri pacientih z zmerno do resno anemijo. (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

**Preglednica 2 - 8:** Preparati železa pri nas, (Glaser M., Borin P., Grmek Zemljič T., Anemija zaradi pomanjkanja železa)

<b>Retafer</b>	Železov sulfat	100 mg tablete
<b>Ferrum Lek</b>	Železov III hidroksid-	100 mg žvečilne tablete
<b>Ferrum Lek sirup</b>	Polimatozni kompleks	50 mgFe/ 5 ml sirup
<b>Haematopan 100</b>	Železov sulfat +	100 mg draže
<b>Haematopan 50</b>	Askorbinska kislina	50 mg draže
<b>Ferrum Lek inj.</b>	Železov saharat	100 mg Fe/ 5 ml amp.
<b>Venofer</b>	Železov saharat	100 mg Fe/ 5 ml amp.

Dosegljive pa so tudi številne druge komponente železa. Nekateri preparati vsebujejo tudi substance, ki krepijo absorpcijo, kar vključuje druge vitamine, aminokisliline in vrsto drugih sestavin. Askorbinska kislina je ena najaktualnejših dodatkov na tržišču. Z njo se poveča absorpcija železa nad vsebnostjo askorbinske kisline 200 mg in več. Istočasno pa povečano vsebnost spremlja tudi povečana možnost stranskih učinkov v prebavilih. Vsi ti preparati so dražji od železovega sulfata in ne zagotavljajo posebnih prednosti pri pacientih. (Hillman, Ault, Rinder, 2011)

### 2.4.7 Parenteralna terapija z železom

Za primere, kjer je prisotna prebavna malabsorpcija ali resna netoleranca na oralne železove preparate, se lahko oprimemo parenteralne terapije z železom.

**Intravensko zdravljenje** s preparati železa je potrebno pri pacientih, ki ne prenašajo tablet, pri malabsorpciji, stanjih po gastrektomijah in pri stanjih, kjer je potrebno hitro nadomestiti železo. Zdravilo apliciramo intravensko, saj je intramuskularna aplikacija boleča. (Glaser M., Borin P., Grmek Zemljič T., Anemija zaradi pomanjkanja železa)

## 2.5 Anemija pri kronični bolezni

Anemija pri kronični bolezni je skupen izraz za klinični sindrom, za katerega je značilno znižano železo in vezalna kapaciteta za železo v serumu, ob tem pa dovolj zalog železa v kostnem mozgu. Razlogov za anemijo je več. Važna je vloga citokinov, ki bodisi direktno vplivajo na eritrocitne prekursorje, motijo metabolizem železa ali delujejo preko eritropoetina (EPO). Pri anemiji zaradi kronične bolezni ni ustreznega odgovora EPO na anemijo.

Kot drugod v razvitem svetu, so tudi pri nas anemije pri kroničnih boleznih (AKB) po pogostosti na drugem mestu, takoj za anemijami zaradi pomanjkanja železa.

AKB razdelimo:

- Anemija pri kroničnih vnetjih (kronične okužbe, revmatoidni artritis, kronična črevesna vnetna bolezen, Hodgkinova bolezen).
- Anemija pri kronični ledvični odpovedi.
- Mieloftizična anemija (zasevki karcinoma pljuč, dojke, ledvic, prostate in ščitnice, maligni limfomi, Gaucherjeva bolezen, miliarna TBC in mielofibroza).
- Anemija pri kronični jetrni bolezni.
- Anemija pri endokrinih boleznih (panhipopituitarizem, hipotireoza, Addisonova bolezen, hipogonadizem pri moškem).

## 2.6 Mielodisplastični sindrom

Pri mielodisplastičnem sindromu gre za vrsto bolezni krvotvornih matičnih celic. Klonsko spremenjena krvotvorna celica se nenormalno razmnoži v nefunkcionalne celice, ki onemogočajo razvoj in pretok zdravih krvnih celic. V preteklosti so tej bolezni rekli prelevkemija, kar pa je rahlo zavajajoče, saj je bolezen že sama po sebi rakava in lahko ogrozi življenje.

Po nastanku je ta lahko primarna (razvije se iz neznanih razlogov; pri 80-90% bolnikih) in sekundarna, ki nastane kot posledica kemoterapije, zdravljenja z ionizirajočimi žarki (obsevanji) ali izpostavljenosti kemijskim substancam, kot je benzen (10-20%). Življenjska doba bolnikov s to boleznijo je zelo različna, nekateri lahko samo s podpornim zdravljenjem živijo dolgo življenje, drugi pa s kemoterapijo in presaditvijo krvotvornih matičnih celic samo nekaj mesecev. Večino MDS zdravimo s transfuzijami eritrocitov. (mielodisplasticni sindrom, limfom-levkemija.org)

Znaki bolezni:

- utrujenost,
- zadihanost,
- ponavljajoče se okužbe,
- krvavitve,
- trombocitopenija,
- nevtropenija.

Pri približno 30% bolnikov z diagnozo MDS bolezen napreduje in se razvije v akutno mieloično levkemijo (AML), zato ga imenujemo tudi prikrita levkemija. Najpogosteje se pojavlja pri starejših ljudeh. (Myelodysplastic syndromes Treatment, cancer topics)

### 2.6.1 Vrste mielodisplastičnih sindromov

Vzrok, da pride do mielodisplastičnega sindroma, je pomanjkanje ali presežek določene vrste zdravih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi. Vrste bolezni, ki jih uvrščamo v mielodisplastični sindrom:

- refraktorna anemija
- refraktorna anemija s prstenastimi sideroblasti
- refraktorna anemija s presežkom blastov
- refraktorna anemija s presežkom blastov v transformaciji

- refraktorna citopenija z displazijo v več celičnih vrstah
- mielodisplastični sindrom z delecijo kromosoma (5q)
- neopredeljiv mielodisplastični sindrom

Dejavniki, ki povečujejo tveganje za razvoj bolezni, so:

- zdravljenje s kemoterapijo ali radioterapijo
- moški in belci
- starost nad 60 let
- izpostavljenost nekaterim kemikalijam, kot so tobačni dim, pesticidi, topila (benzen)
- izpostavljenost težkim kovinam, kot so živo srebro ali svinec  
(Myelodysplastic syndromes Treatment, cancertopics)

## 2.6.2 Spremembe v krvi in kostnem mozgu pri mielodisplastičnem sindromu

### **Refraktorna anemija:**

Motena je eritropoeza in nastaja premalo eritrocitov, zato pri bolniku pride do anemije. Število belih krvnih celic in trombocitov ostane enako.

### **Refraktorna anemija s prstenastimi sideroblasti:**

Anemija zaradi pomanjkanja rdečih krvnih celic, v katerih je tudi presežek železa. Število trombocitov in levkocitov je enako.

### **Refraktorna anemija s presežkom blastov:**

Anemija zaradi pomanjkanja rdečih krvnih celic. Od 5-19 % celic v kostnem mozgu je blastov, v krvi pa je normalno število blastov. Možne so tudi spremembe pri levkocitih in trombocitih. Ta anemija včasih napoveduje akutno mieloično levkemijo.

### **Refraktorna anemija s presežkom blastov v transformaciji:**

Anemija zaradi pomanjkanja rdečih krvnih celic, levkocitov in trombocitov. 20- 30 % celic v kostnem mozgu so blasti in več kot 5 % celic v krvi so blastne celice. To anemijo včasih poimenujemo kar akutna mieloična levkemija.

Pomen določanja serumskega železa pri sumu na mikrocitno anemijo

### **Refraktorna citopenija z displazijo v več celičnih vrstah:**

V krvi je pomanjkanje vsaj dveh od treh vrst krvnih celic. Manj kot 5 % celic v kostnem mozgu je blastov in manj kot 1 % celic v krvi je blastnih celic. Obstaja možnost, da pri prizadetosti prav rdečih krvnih celic govorimo o presežku železa.

### **Mielodisplastični sindrom z delecijo kromosoma (5q):**

Anemija zaradi pomanjkanja rdečih krvnih celic. Manj kot 5% celic v kostnem mozgu in v krvi so blasti. Tukaj gre za točno določeno spremembo na kromosomu.

### **Neopredeljiv mielodisplastični sindrom:**

Pomanjkanje ene vrste krvnih celic v krvi. Število blastov v kostnem mozgu in krvi je normalno, bolezen pa kljub vsemu ne spada v nobenega od zgoraj naštetih tipov.

(Myelodysplastic syndromes Treatment, cercertopics)

## **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

Eksperimentalni del sem opravljala na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.

Namen tega dela je bila določitev krvne slike s pretočno citometrijo. Za primerjavo sem vzela dve skupini bolnikov:

- bolniki z anemijo zaradi pomanjkanja železa
- bolniki z refraktorno anemijo

### ***3.1 Metode in principi***

Izsledke kvalitativnih in kvantitativnih preiskav celic v periferni krvi imenujemo krvna slika. Krvno sliko razdelimo na rdečo, belo ter na trombocite. Ker boleznim večkrat zasledujemo s krvno sliko, je za določitev in pravilno vrednotenje potrebno opraviti celotno krvno sliko. Analizo krvnih celic opravljajo hematološki analizatorji. Štetje celic, kot tudi lastnosti, poteka s pomočjo optične ali električne detekcije, lahko pa sta zavzeti kar obe.

Uporabili smo hematološki analizator Sismex 2100 Xe, ki se uporablja za štetje celic in merjenje njihove velikosti. V stojala vložimo epruvete s kapilarno in venozno krvjo ter

dodanim antikoagulacijskim sredstvom  $K_3EDTA$ . Epruvete vstopajo v aparat na desni strani in izstopajo na levi strani. Dve epruveti se med procesom v aparatu dvigneta in vsebina med njima se premeša. Gumijaste čepice na vrhu epruвет se med prehodom skozi aparat predrejo. Epruveta je obrnjena navzdol in skozi predrto gumico se odvzame vzorec. Kri se razredči in se taka pretaka skozi aparat.

Karakteristike celic so izmerjene s pomočjo električne impedenca in laserske svetlobe. Ob prehodu celice skozi snop laserske svetlobe se pojavi sipanje svetlobe. Nastalo fluorescence in sipano svetlobo zaznajo detektorji. Ker želimo kri določati na različne parametre, jo razdelimo na merilne kanale, kot so WBC/BASO, WBC-4 DIFF (levkociti), IMI (immature cells – nezrele celice), RET (retikulociti), RBC (eritrociti) in NRB (normoblasti). Aparat meri spremembo električnega toka oz. prevodnosti v določeni prevodni točki, v kateri delci prehajajo skozi majhno odprtino v številnih kapilarah. (Sysmex 2100 Xe)

#### **Sestavni deli aparata:**

- merilna komora (homogena suspenzija celic),
- el. prevodna izotonična raztopina,
- notranja (+) in zunanja (-) elektroda,
- kapilara z odprtino.

#### **Zaznava meritev:**

- Celica v odprtini pokaže trenuten porast upornosti – na ta način dobimo električni impulz.
- Število impulzov pove število celic.
- Amplituda impulza nam poda volumen celice.

#### **Histogram:**

- Štetje celic glede na velikost.
- Izriše se porazdelitvena krivulja, iz katere se določi povprečni volumen celice.
- S tem dobimo SD in izračuna se razpršenost volumna okoli srednje vrednosti.

Indeks variacije velikosti celice nam pove, kako so celice razporejene okrog srednje vrednosti. Rezultati meritev se pokažejo v obliki točkovnih diagramov in izpišejo se vrednosti posameznih meritev.

## 3.2 Krvni razmaz (*diferencialna krvna slika*)

Pravilno izdelan krvni razmaz mora imeti v najtanjšem delu redko posejane eritrocite (v otočkih), temu sledi pas celic s »pravo gostoto«, ki mora biti čim širši, ves preostali del razmaza pa zavzema pregosti del. Analiziramo le obarvane krvne razmaze. Barvamo jih za diferencialno krvno sliko in za opazovanje celic (zlasti malignih) po predhodnem citokemičnem barvanju. Celice opazujemo v »pravi gostoti«, kjer so eritrociti razločno vidni in nanizani drug zraven drugega brez večjih otočkov. V pregostem delu razmaza se eritrociti prekrivajo, zato ne moremo opazovati njihove morfologije, morfologija levkocitov pa je popačena.

Idealen krvni razmaz mora biti homogen, na koncu zaobljen, prave dolžine (ne predolg in ne prekratek), na začetku gost in na koncu tanek. Meja med gostim in tankim delom razmaza mora biti vidna tudi s prostim očesom.

Vakuoliziran krvni razmaz je posledica nečistih predmetnih stekel, kar vpliva na kvaliteto barvanja. Na kvaliteto barvanja vpliva tudi pH stekel in nepravilno sušenje ter shranjevanje razmazov. (Pivk, 2007)

Čeprav z analizatorji dobimo izsledke hitro, natančno in poceni, je za nekatere vzorce potrebno pregledati razmaz krvi (napraviti diferencialno krvno sliko). Zaradi raznolikosti morfologije krvnih celic analizator ne more oceniti, ali so te celice nenormalne.

Priporoča se, da se naredi razmaz krvi:

- če sumimo na krvno bolezen,
- če je število levkocitov večje od  $15 \times 10^9/l$ ,
- če je število trombocitov manjše od  $100 \times 10^9/l$ ,
- če je povišan delež posameznih levkocitov (nevtrofilcev  $> 0.80$ , limfocitov  $> 0.50$ , monocitov  $> 0.15$ , eozinofilcev  $> 0.20$ , bazofilcev  $> 0.20$ ),
- če je v izpisu opozorilo o morfoloških nepravilnostih,
- če so spremembe v grafični predstavitvi levkocitov, kot je slaba ločitev celičnih populacij, nepravilna lega ali dodatna populacija celic.

### 3.2.1 Material

**Kompletna krvna slika:**

- epruveta z vzorcem krvi,
- stojalo za epruvete,



- hematološki analizator Sysmex 2100 Xe.

**Krvni razmaz (diferencialna krvna slika):**

- epruveta z vzorcem krvi,
- objektno stekelce,
- mikroskop,
- Schifendeckerjeva posoda,
- metanol,
- barvilo May-Grunwald (raztopina eozina in metilenskega modrila v metanolu),
- raztopina Giemsa,
- destilirana H<sub>2</sub>O.

**3.2.2 Postopek****Kompletna krvna slika:**

- Ko vklopimo aparat, ga preizkusimo s tremi kontrolnimi vzorci znanih vrednosti za belo in rdečo krvno sliko. Rezultati kontrolnih vzorcev morajo ustrezati vrednostim, ki jih predpisuje proizvajalec.
- Vzorec krvi, ki ga bomo analizirali, je odvzet v epruveti s K<sub>3</sub>EDTA.
- Vsebino epruvete premešamo, nato pa epruveto vstavimo v stojalo, ki ga damo v aparat, in pričnemo z meritvijo.
- Po končani meritvi se vrednosti krvne slike izpišejo na ekranu računalnika.

**Krvni razmaz (diferencialna krvna slika):**

- Za pripravo krvnega razmaza uporabimo čisto objektno steklo, na katerega kanemo majhno kapljico svete kapilarne ali venske krvi z dodanim antikoagulacijskim sredstvom K<sub>3</sub>EDTA.
- S palcem in kazalcem desne roke primemo drugo steklo, s katerim bomo razmazali kri, in ga pod kotom 25-30° postavimo na objektno steklo, tik pred kapljico krvi.
- Stekelce počasi premaknemo v desno, da zajamemo kapljico krvi, nato z enakomernim pritiskom na površino hitro potegnemo po objektnem steklu.
- Ob tem ne smemo spreminjati nagiba in pritiska na objektno steklo. Debelina krvnega razmaza je odvisna od pritiska na površino objektnega stekla, od kota in hitrosti potega.

- Krvni razmaz mora biti tanek, enakomeren in mora imeti ravne stranske robove. Pokriva naj približno  $\frac{1}{2}$  površine v sredini objektnega stekla in ne sme segati do roba objektnega stekla.
- Krvni razmaz označimo in pustimo, da se najmanj pol ure suši na zraku pri sobni temperaturi.
- Posušeni razmaz 5 min fiksiramo v Schifendeckerjevi posodici z metanolom.
- Barvamo 5 min z barvilom May-Grunwald.
- 1 min namakamo z destilirano H<sub>2</sub>O, nato še 1-2 min izpiramo z barvilom.
- 15 ali 16 min barvamo z raztopino Giemsa. Speremo s tekočo vodo in posušimo.
- Pri barvanju moramo biti pozorni na to, da razmazi niso starejši od 12 ur, da so stekla neoporečna, destilirana H<sub>2</sub>O mora imeti pH 6.0-6.5, v bližini barvanja ne sme biti koncentrirane kisline ali luga.
- Pri mikroskopskem pregledu obarvanih krvnih razmazov najprej z majhno povečavo poiščemo vidno polje.
- Na tanek, zaobljen del razmaza kanemo kapljico imerzijskega olja in s 1000x povečavo ocenimo vse vrste celic, ki jih vidimo. Zabeležimo vsak levkocit, ki ga vidimo ter ga opredelimo. Pozornost posvetimo morebitnim morfološkim spremembam citoplazme in jedra.
- Za oceno moramo pregledati najmanj 200 celic v krvnem razmazu.
- Absolutno število posameznih vrst levkocitov dobimo tako, da število vseh levkocitov pomnožimo z deležem za posamezno vrsto. (Hematološki preiskave, UKC Maribor)

### ***3.3 Hematološki kazalci in principi***

Hematološka preiskava vključuje štetje krvnih celic: eritrocitov, levkocitov in trombocitov. Merimo tudi koncentracijo hemoglobina v krvi, število eritrocitov in volumski delež eritrocitov. Izračunajo se še hematološki parametri (hematokrit): MCV, MCH, MCHC.

#### **3.3.1 Določevanje koncentracije eritrocitov v krvi**

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, od sestave zraka in od različnih vrst bolezni. Te vrednosti so lahko normalne, zvišane ali znižane.

Če so te vrednosti znižane (eritropenija), so te običajno posledica kakšnih krvavitev, razpadanja eritrocitov, strjevanja eritrocitov ali spremenjenega nastajanja eritrocitov (eritropoeza).

Zvišane vrednosti (eritrocitoza) so posledica bolezni, lahko pa gre za nepravilno razmerje med plazmo in celicami v krvi zaradi izgub, kot so driska, bruhanje, znojenje, zbiranje tekočin v telesnih votlinah. (koncentracija eritrocitov, UKC Maribor)

- **Merjenje:**

Merimo spremembo upornosti v raztopini elektrolita. V izotonično raztopino elektrolita sta potopljeni dve elektrodi, ločeni s stekleno kapilaro. Skozi kapilaro teče tok skupaj s suspendiranimi delci. Med elektrodama pa je enosmerni električni tok. Na vsaki strani odprtine imamo tok reagenta, ki preprečuje uhajanje celic in omogoča laminarni tok suspenzije. Pri prehodu celice skozi odprtino se upornost poveča, kar registriramo kot spremembo signala na elektrodi. Sprememba je sorazmerna številu celic, velikost signala pa odvisna od velikosti celic. Referenčne vrednosti se gibljejo v intervalu:  $4,2-6,3 \times 10^{12}/L$ . (koncentracija eritrocitov, UKC Maribor)

### 3.3.2 Določevanje vrednosti hemoglobina v krvi

- **Merjenje:**

Odvzamemo kapilarno ali venozno kri in dodamo antikoagulacijsko sredstvo  $K_3EDTA$  (kalijev etilendiamin tetra očetna kislina). SLS (sodium lauryl sulfate, Na dodecil sulfat- $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ) lizira eritrocite in spremeni konformacijo hemoglobina. Ta se oksidira v hemiglobinsulfat. SLS v raztopini skupaj s hemiglobinsulfatom tvori stabilno kompleksno raztopino SLS-Hb. Metoda se opravi hitro in zraven se oksidirajo tudi derivati hemoglobina. Merimo absorbanco raztopine pri valovni dolžini 555 nm. Rezultate prikažemo v g/L. (vrednost hemoglobina, UKC Maribor)

### 3.3.3 Določevanje MCV v krvi

Meritve MCV so pomembne pri določevanju:

- Mikrocitoze: kronične bolezni, talasemija, pomanjkanje železa, fragmentacija eritrocitov, hemoglobin H bolezni
- Makrocitoze: aplastična anemija, prelevkemija, pomanjkanje folatov, pomanjkanje  $B_{12}$ , imunska hemolitična anemija, hladna aglutinacija, KLL

- Normalen MCV: normalno, kronične bolezni, hemoglobinopatije, transfuzija, kemoterapija, KML, hemoragija, hereditarne sferocitoze, pomanjkanje različnih snovi, pomanjkanje železa ali folatov, mielofibroza, sideroblastna anemija.

- **Merjenje:**

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

Enačba:

$$MCV = Hct * 10 / RBC \text{ (fL)}$$

Referenčne vrednosti:

$$81-94 \text{ fL (1fL} = 10^{-15} \text{ L)}$$

(MCH, UKC Maribor)

### 3.4 Analiza retikulocitov

Retikulocit je nezrel eritrocit, ki se pri barvanju še živih celic zunaj organizma obarva z briljantnim krezilnim modrilom. Obarva se pravzaprav ribosomalna RNK, ki daje ritukularen (mrežast) videz, po čemer so celice tudi dobile ime.

Retikulociti v krvi predstavljajo okoli 1% rdečih krvničk. Razvijajo se in dozorevajo v rdečem krvnem mozgu, nato krožijo približno en dan v krvnem obtoku ter naposled dozorejo v zrelo rdečo krvničko. Kot zrela rdeča krvnička tudi retikulocit nima jedra. (wikipedia)

Z merjenjem retikulocitov lahko razlikujemo anemije zaradi zmanjšane proizvodnje eritrocitov od anemij zaradi zvečane razgradnje ali izgube eritrocitov, ocenimo zdravljenje anemij ter obnovitvene sposobnosti kostnega mozga. (Retikulociti, UKC Maribor)

- **Merjenje:**

V citoplazmi mladih eritrocitov so še ostanki RNA v obliki mreže ali zrn, ti se v posebnem merilnem (RET) kanalu obarvajo z dvema barviloma (polimetin in oktazin). Barvili se po predhodni permeabilizaciji (predrtju) celičnih membran vežeta na nukleinske kisline. Zreli eritrociti, ki ne vsebujejo nukleinskih kislin, se ne obarvajo. Obarvani eritrociti pri prehodu skozi laserski žarek tako oddajajo fluorescenco in sipajo svetlobo. Sipanje svetlobe pod majhnim kotom (FSC) je sorazmerno velikosti celice. (Sysmex 2100 Xe, svetovni splet)

#### Številčna vrednost retikulocitov:

- Relativno število retikulocitov

Aparat prešteje retikulocite in izsledek navede v odstotkih.

- Absolutno število retikulocitov

Pomen določanja serumskega železa pri sumu na mikrocitno anemijo

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

$$\text{Št. Retikulocitov/L} = (\% \text{ retikulocitov} \times \text{število eritrocitov / L}) / 100$$

Referenčne vrednosti:

Ret= retikulociti absolutno  $21,0-94,0 \times 10^9/\text{L}$

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

Povečano število retikulocitov v periferni krvi je 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, B12 ali folata, prav tako pri anemijah zaradi kroničnih bolezni (kronično vnetje, maligni tumorji, kronične poškodbe ledvic, aplastična anemija. (Retikulociti, svetovni splet)

### ***3.5 Biokemijski kazalci in principi***

Kri sestavljajo celice in krvna plazma. Feritin in transferin sta plazemski beljakovini, na kateri je vezano železo. Serumsko železo in feritin, ki se sprostita iz transferina, nam pokažeta vrednosti železa v telesu.

Serum je tekoča frakcija krvi, ki so ji s centrifugiranjem odstranili krvne celice in faktorji strjevanja krvi.

#### **3.5.1 Določevanje železa v krvnem serumu**

- **Meritve:**

V kislem mediju se iz transferina sprostijo  $\text{Fe}^{3+}$  ioni, ki se ob prisotnosti askorbinske kisline reducirajo v  $\text{Fe}^{2+}$  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.

- **Referenčna vrednost:**

V serumu pri 37° C: moški 11,6-31,3  $\mu\text{mol/L}$

ženske: 9,0-30,4  $\mu\text{mol/L}$

(Železo v serumu in plazmi, Centralni laboratorij)

### 3.5.2 Določevanje feritina v krvnem serumu

Serumski feritin je indikator zaloga železa v telesu. Koncentracija feritina pod 20 µg/l vedno kaže na pomanjkanje železa, višje vrednosti pa na prekomerno odlaganje železa v telesu. Tako je feritin tudi pomemben faktor za ločevanje med anemijo zaradi pomanjkanja železa in anemijo zaradi kroničnih bolezni.

- **Merjenje:**

Vzorec se inkubira z delci kromovega dioksida, vezanimi na monoklonalna protitelesa, in konjugiranim reagentom. Tvori se kompleks dioksin-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 in sprosti kromofor (CPR). Koncentracija feritina v vzorcu je sorazmerna s koncentracijo sproščenega kromofora in intenziteto nastalega barvnega kompleksa.

- **Referenčne vrednosti:**

V serumu pri 37° C: moški 26 – 388 µg/L

ženske: 8 – 252 µg/L

(Feritin v serumu in plazmi, Centralni laboratorij)

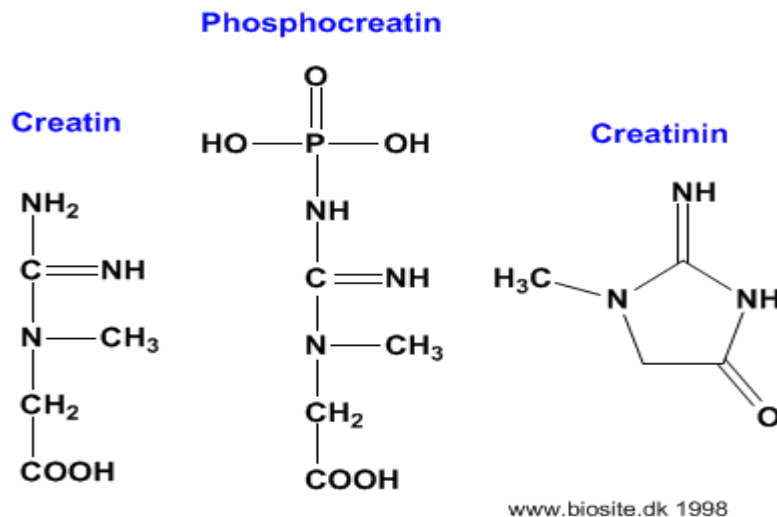
### 3.5.3 Določevanje kreatinina

Kreatinin je stranski produkt proteina kreatina, ki priskrbi energijo za krčenje mišic. Je endogena substanca in nastaja kot stranski produkt metabolizma skeletnih mišic v presnovi fosfokreatina z neencimsko ciklizacijo.

Iz mišic se ga sprosti približno 1 mg/min. Plazemska koncentracija kreatinina je stalna (1,1mmol/l), zato metabolizem in prehrana nanjo ne vplivata.

Telo kreatinin izdeluje dokaj sorazmerno in počasi. Količina proizvedenega kreatinina je odvisna od mišične mase. Večji je vnos beljakovin, večja je mišična masa, večja je količina kreatinina. Pri športnikih je povečana količina kreatinina povsem normalen pojav, medtem ko je pri ljudeh, ki se ne ukvarjajo s športom redno, to znak za okvaro ledvic, saj se preko njih filtrira.

Povečana koncentracija serumskega kreatinina je tudi znak za srčno-žilne bolezni. Majhne količine kreatinina se zbirajo v tubulih. Z nivojem kreatinina lahko ocenimo ledvično delovanje, izražen je v enoti µmol/l.



**Slika 3. 1:** KEMIJSKA FORMULA KREATINA, FOSFOKREATINA IN KREATININA

(kreatinin, wikipedia)

- **Merjenje:**

Serumsko koncentracijo kreatinina določamo s kinetično Jaffejevo metodo na biokemičnem analizatorju BM/Hitachi 912 proizvajalca Boehringer Mannheim. To je povsem avtomatiziran, računalniško voden analizator z možnostjo programiranja. Z njim lahko izvajamo kvantitativne ali kvalitativne določitve številnih analitov v bioloških vzorcih.

Sestavljata ga dve enoti:

- analizna enota, ki vključuje sistem za procesiranje vzorcev in sistema za fotometrično in potenciometrično merjenje;
- kontrolna enota z računalnikom in tiskalnikom.

- **Referenčne vrednosti:** 70-140  $\mu\text{mol/L}$

(kreatinin-vaje, svetovni splet)

### 3.5.4 Določevanje CRP-ja

CRP ali C-reaktivni protein je protein akutne faze, ki je pri zdravih osebah prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Ta se poveča pri poškodbah tkiva zaradi bakterijske infekcije in po operacijah. Pri virusnih okužbah običajno ni povišanja CRP-ja, zato lahko razlikujemo med bakterijskimi in virusnimi infekcijami.

- **Merjenje**

Kvantitativno nefelometrično ali turbidometrično merjenje koncentracije CRP v kapilarni krvi, venozni krvi, serumu ali plazmi.

CRP merimo enostavno, hitro in zanesljivo s fotometrom Quik Read CRP.

- vzorec: kapilarna kri, venozna kri, serum ali plazma
- kvantitativni rezultat v treh minutah
- izreden pomen v diferencialni diagnostiki
  - **Referenčne vrednosti:**
- pod 20 mg/L.....normalne vrednosti, z veliko gotovostjo lahko izključimo bakterijsko okužbo
- 20-99 mg/L.....povišane vrednosti, sum na lokaliziran bakterijski proces
- nad 100 mg/L.....povišane vrednosti, sum na invazivno bakterijsko okužbo (CRP, svetovni splet)

## 4 REZULTATI

### 4.1 Rezultati meritev, opravljeni pri pacientih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Spol	Ret-r	Ret	K-Hb	K-Erci	MCV	CRP	Fe	Transfe	Feritin	Kreatinin
Ž	0,68	29,2	129	4.29	87.9	<3	20.2	-	30	61
Ž	0,09	2,0	62	2.19	81.7	12	26.8	-		63
Ž	1,60	69,9	134	4.37	92.4	-	9.3	3.3	13	63
Ž	0,75	29,8	108	3.97	81.4	-	8.5	-	4	71
Ž	1,39	43	97	3.09	95.1	5	11.7	-	961	304
Ž	1,19	54,7	134	4.6	96.1	-	13.6	-	23	-
Ž	6,60	186,8	81	2.83	89.8	2	7.9	2.5	24	64
Ž	2,21	81,8	122	3.7	100.3	12	6.7	2	120	58
M	1,38	59,5	95	4.31	68.2	1	68.6	2.7	60	76
Ž	0,74	20,8	89	2.81	97.2	2	38.4	-	441	72

V preglednici lahko vidimo, da določene meritve transferina in CRP ja niso bile izvedene.



**4.2 Rezultati meritev, opravljeni pri pacientih z refraktorno anemijo**

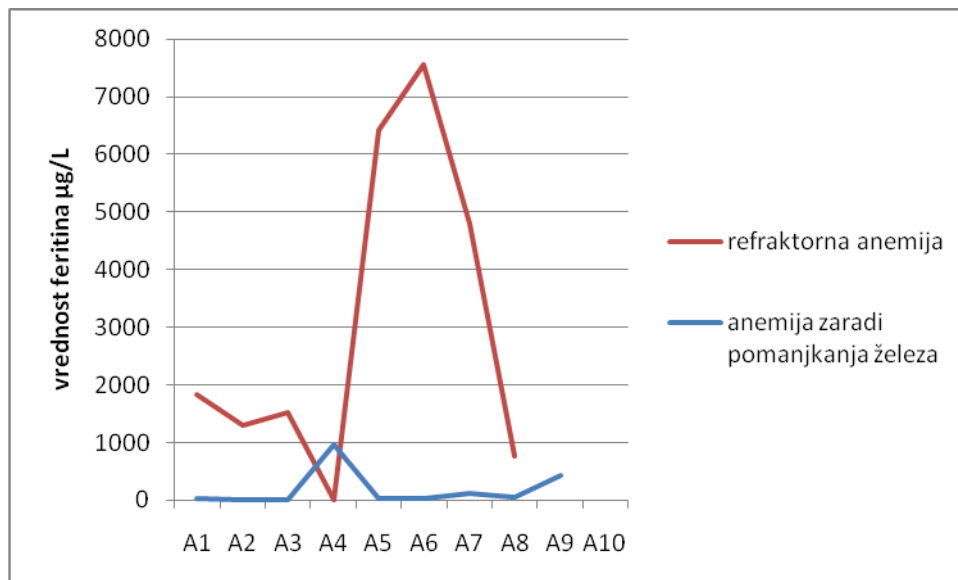
Spol	Ret-r	Ret	K-Hb	K-Erci	MCV	CRP	Fe	Trans fe	Feritin	krea tinin
Ž	0,36	11,6	96	3,21	86,9	99	25,3	1,39	1833	146
M	0,91	32,1	116	3,53	97,2	2	21,5	-	1304	116
M	1,10	37,0	117	3,36	100,9	24	25,2	1,10	1514	153
Ž	0,84	33,1	123	3,94	94,9	1	10,8	-	12	95
M	0,20	5,0	74	2,50	84,4	118	19,7	0,76	6428	353
Ž	0,10	1,8	50	1,79	81,0	119	12,9	1,02	7557	98
M	0,08	2,3	84	2,77	88,1	229	19,6	0,84	4803	290
M	0,94	25,6	91	2,72	99,3	1	33,3	4	758	80

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 Vrednotenje rezultatov

#### 5.1.1 Vrednosti feritina

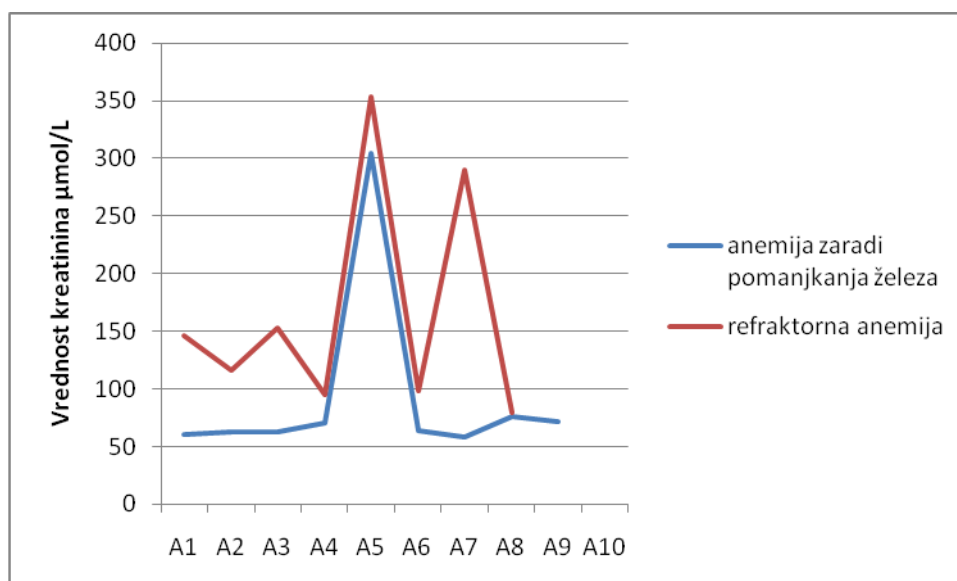
Slika 5.1 prikazuje vrednosti feritina pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in pri bolnikih z refraktorno anemijo. Referenčne vrednosti feritina so 8-388 µg/L. Odstopanja opazimo predvsem pri pacientih z refraktorno anemijo, pri katerih določene vrednosti kar krepko presegajo referenčno območje, kar pa je posledica nalaganja železa v celicah RES, sklepamo, da zaradi pogostih transfuzij.



**Slika 5.1:** VREDNOSTI FERITINA PRI BOLNIKIHZ REFRAKTORNO ANEMIJO IN PRI BOLNIKIHZ ANEMIJO ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA

#### 5.1.2 Vrednosti kreatinina

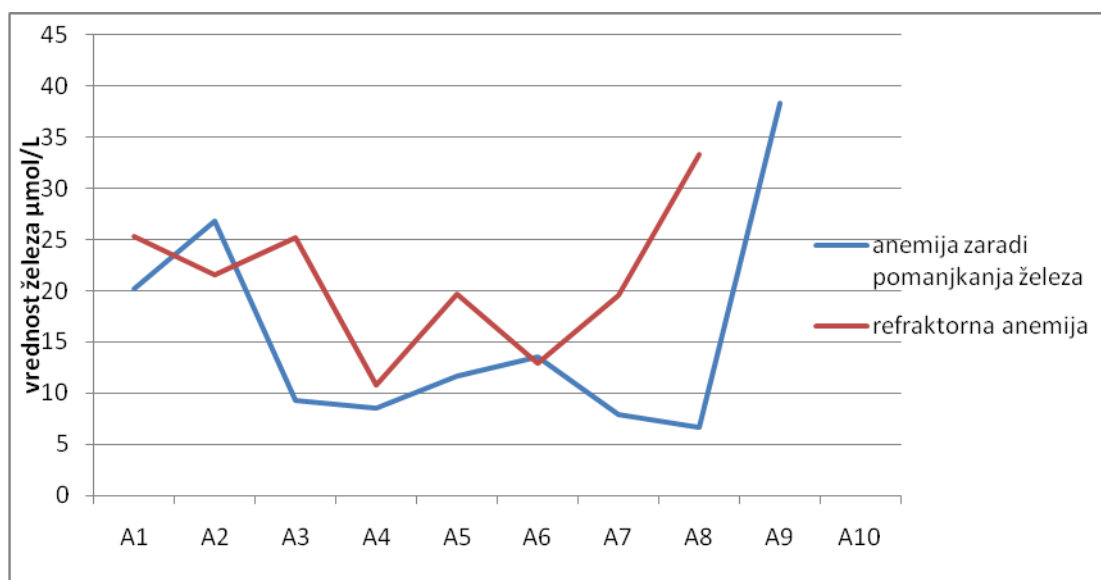
Slika 5.2 prikazuje vrednosti kreatinina, ki so tudi tukaj višje pri pacientih z refraktorno anemijo, v primerjavi z anemijo zaradi pomanjkanja železa. Povprečje pri prvih je 166,38 µmol/l, pri slednjih pa 92,44 µmol/l. Glede na to, da so referenčne vrednosti za kreatinin 70-140 µmol/l, vidimo, da bolniki z refraktorno anemijo nekoliko izstopajo iz tega območja.



**Slika 5.2:** VREDNOSTI KREATININA PRI BOLNIKIH Z REFRAKTORNO ANEMIJO IN PRI BOLNIKIH Z ANEMIJO ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA

### 5.1.3 Vrednosti železa

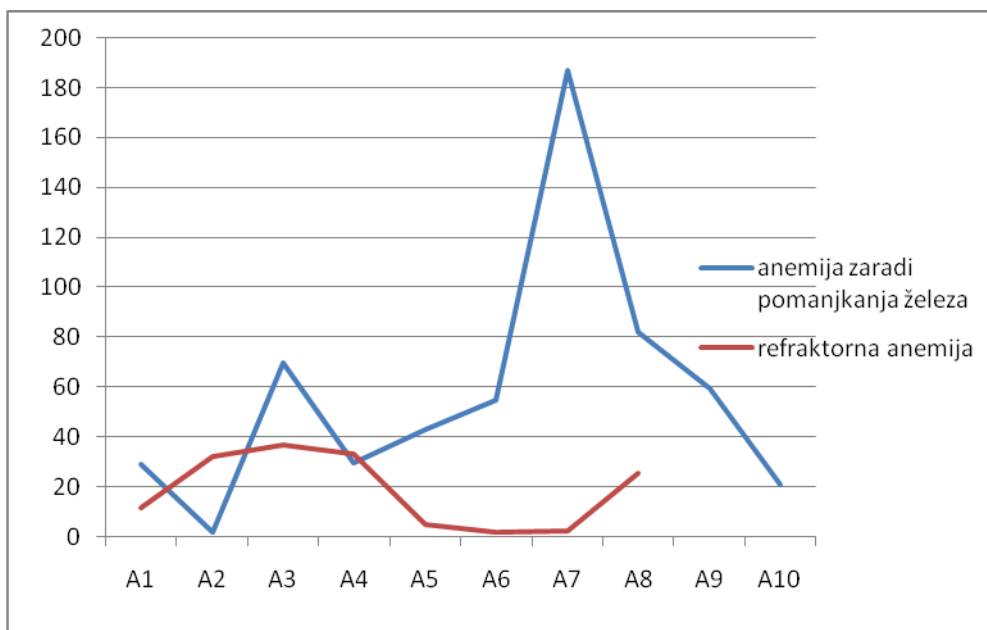
Slika 5.3 prikazuje vrednosti železa. Povprečne vrednosti pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa so 15,9, pri bolnikih z refraktorno anemijo pa 21,04.



**Slika 5.3:** VREDNOSTI ŽELEZA PRI BOLNIKIH Z ANEMIJO ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA IN PRI BOLNIKIH Z REFRAKTORNO ANEMIJO

### 5.1.4 Vrednosti retikulocitov

Slika 5.4 prikazuje vrednosti retikulocitov pri obeh skupinah. Po izračunih je povprečje pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa 57,75, pri bolnikih z refraktorno anemijo pa 18,5652. Skepamo, da je bil vzrok MDS pri teh bolnikih refraktarna anemija z motenim nastajanjem eritrocitov.



**Slika 5.4:** VREDNOSTI RETIKULOCITOV PRI ANEMIJAH ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA IN PRI REFRAKTORNIH ANEMIJAH

## 5.2 Statistična obdelava podatkov

Za obdelavo statistične analize vzorca smo imeli v okviru laboratorijskega centra na razpolago deset pacientov,  $N=10$ , pri bolnikih z anemijo zaradi pomanjkanja železa in 8 pacientov pri bolnikih z refraktorno anemijo,  $N=8$ . Za obdelavo statističnih podatkov sem izbrala Pearsonovo korelacijo. Ta nam dokazuje, da sta spremenljivki v odvisnosti takrat, ko se vrednost približuje številu 1, to pomeni, da se spremenljivka A povečuje, če se povečuje tudi spremenljivka B. Oziroma, če se vrednost približuje -1, pomeni da se spremenljivka A obratno sorazmerna na spremenljivko B. Pri določenih pacientih ugotavljamo, da pri posameznih variablah niso dani podatki, kar pomeni da analiza programa SPSS ne more prikazovati točnih izračunov soodvisnosti, prav zaradi nepodanih vrednosti. Sig nam poda pomembnost povezave. Če je  $< 0,01$ , pomeni, da sta dobro povezani.

## Statistična obdelava za paciente z anemijo zaradi pomanjkanja železa

		Fe	Kreatinin	Ret	Kerci	KHb	Transferin	Feritin	CRP	MCV	RetR
Fe	Pearson Correlation	1	-,061	- ,278	,054	-,085	,000	,014	- ,607	-,162	-,239
	Sig. (2-tailed)		,877	,437	,882	,816	1,000	,972	,149	,654	,506
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10
Kreatinin	Pearson Correlation	-,061	1	- ,065	,250	,000	. <sup>a</sup>	,945 <sup>**</sup>	,028	,395	-,043
	Sig. (2-tailed)	,877		,869	,516	1,000	,000	,000	,953	,292	,912
	N	9	9	9	9	9	4	8	7	9	9
Ret	Pearson Correlation	-,278	-,065	1	-,231	-,160	,000	-,182	- ,225	-,058	,985 <sup>**</sup>
	Sig. (2-tailed)	,437	,869		,522	,660	1,000	,639	,628	,874	,000
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10
Kerci	Pearson Correlation	,054	,250	- ,231	1	,843 <sup>**</sup>	,000	-,114	,079	,333	-,252
	Sig. (2-tailed)	,882	,516	,522		,002	1,000	,770	,867	,347	,483
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10
KHb	Pearson Correlation	-,085	,000	- ,160	,843 <sup>**</sup>	1	,000	-,279	,233	,361	-,224
	Sig. (2-tailed)	,816	1,000	,660	,002		1,000	,466	,615	,305	,534
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10
Transferin	Pearson Correlation	,000	. <sup>a</sup>	,000	,000	,000	1	. <sup>a</sup>	- 1,000 <sup>**</sup>	,000	-,171
	Sig. (2-tailed)	1,000	,000	1,000	1,000	1,000		,000	,000	1,000	,829
	N	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4
Feritin	Pearson Correlation	,014	,945 <sup>**</sup>	- ,182	-,114	-,279	. <sup>a</sup>	1	,056	,416	-,154
	Sig. (2-tailed)	,972	,000	,639	,770	,466	,000		,916	,266	,693
	N	9	8	9	9	9	4	9	6	9	9
CRP	Pearson Correlation	-,607	,028	- ,225	,079	,233	-1,000 <sup>**</sup>	,056	1	,196	-,225
	Sig. (2-tailed)	,149	,953	,628	,867	,615	,000	,916		,673	,628
	N	7	7	7	7	7	3	6	7	7	7
MCV	Pearson Correlation	-,162	,395	- ,058	,333	,361	,000	,416	,196	1	-,116

	Sig. (2-tailed)	,654	,292	,874	,347	,305	1,000	,266	,673		,749
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10
		Fe	Kreatinin	Ret	Kerci	KHb	Transferin	Feritin	CRP	MCV	RetR
RetR	Pearson Correlation	-,239	-,043	,985**	-,252	-,224	-,171	-,154	-,225	-,116	1
	Sig. (2-tailed)	,506	,912	,000	,483	,534	,829	,693	,628	,749	
	N	10	9	10	10	10	4	9	7	10	10

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### Statistična obdelava za paciente z refraktorno anemijo

Correlations											
		RetR	Ret	KHb	Kerci	MCV	CRP	Fe	Transferin	Feritin	Kreatinin
RetR	Pearson Correlation	1	,488	,165	,378	,378	,293	,204	,307	,184	,000
	Sig. (2-tailed)		,220	,695	,356	,356	,482	,629	,554	,663	1,000
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
Ret	Pearson Correlation	,488	1	,339	,258	,258	,067	-,325	-,097	-,404	,258
	Sig. (2-tailed)	,220		,411	,537	,537	,875	,433	,855	,320	,537
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
KHb	Pearson Correlation	,165	,339	1	,729*	,729*	-,640	,393	,860*	-,654	-,292
	Sig. (2-tailed)	,695	,411		,040	,040	,087	,336	,028	,079	,483
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
Kerci	Pearson Correlation	,378	,258	,729*	1	,500	-,258	,180	,486	-,270	-,250
	Sig. (2-tailed)	,356	,537	,040		,207	,537	,670	,329	,518	,550
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
MCV	Pearson Correlation	,378	,258	,729*	,500	1	-,775*	,539	,777	-,486	-,500
	Sig. (2-tailed)	,356	,537	,040	,207		,024	,168	,069	,222	,207
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8

		RetR	Ret	KHb	Kerci	MCV	CRP	Fe	Transferin	Feritin	kreatinin
CRP	Pearson Correlation	,293	,067	-,640	-,258	-	1	-,417	-,676	,627	,516
	Sig. (2-tailed)	,482	,875	,087	,537	,024		,304	,141	,096	,190
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
Fe	Pearson Correlation	,204	-,325	,393	,180	,539	-,417	1	,983**	,126	-,359
	Sig. (2-tailed)	,629	,433	,336	,670	,168	,304		,000	,766	,382
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
Transferin	Pearson Correlation	,307	-,097	,860*	,486	,777	-,676	,983**	1	-,676	-,536
	Sig. (2-tailed)	,554	,855	,028	,329	,069	,141	,000		,141	,273
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Feritin	Pearson Correlation	,184	-,404	-,654	-,270	-,486	,627	,126	-,676	1	,486
	Sig. (2-tailed)	,663	,320	,079	,518	,222	,096	,766	,141		,222
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
Kreatinin	Pearson Correlation	,000	,258	-,292	-,250	-,500	,516	-,359	-,536	,486	1
	Sig. (2-tailed)	1,000	,537	,483	,550	,207	,190	,382	,273	,222	
	N	8	8	8	8	8	8	8	6	8	8
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).											
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).											

## 6 Sklep

### Ugotovitve pri pacientih z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Kot pričakovano, so rezultati pokazali znižano koncentracijo železa. Potrdili smo tudi predpostavko, da sta srednji celični volumen (MCV) in srednji celični hemoglobin (MCH) neobčutiljiva parametra.

Ugotovitve:

-Korelacija med številom eritrocitov in hemoglobina.

-Statistične meritve so pokazale, da število retikulocitov ne korelira s koncentracijo železa, kar si razlagamo s tem, da je lahko število retikulocitov zvišano zaradi prikritih krvavitev (npr. menstrualne krvavitve) ali bolnik uživa železove pripravke.

-Ugotovljena je bila tudi negativna korelacija med CRP in transferinom, namreč predpostavka je, da v času menstruacije ali krvavitve pride do izločanja številnih citokinov, ki vplivajo na spremenjeno absorpcije železa kot tudi vgrajevanje železa v feritin.

- Nismo uspeli dokazati predpostavke, da korelira koncentracija železa s feritinom. Ta namreč pravi, da se ob znižanju te koncentracije, tudi nivo feritina v telesu zniža. Možno je, da so bolniki prejeli pripravke železa ali transfuzijo.

Sklepamo, da je določevanje železa pri bolnikih s sumom na anemijo zaradi pomanjkanja železa prikladna metoda, seveda ob upoštevanju vseh faktorjev, ki lahko vplivajo na njegove spremembe (nepojasnjeno vnetje, krvavitve, ledvična bolezen...). Kot kemik lahko samo sklepam, da gre za pomanjkanje železa, ključna oseba, da ugotovi ta simptom, pa je zdravnik, ki kontaktira z bolnikom.

### Ugotovitve pri pacientih z refraktorno anemijo

Pri refraktorni anemiji gre za poškodbo matičnih celic in posledično zmanjšano tvorbo retikulocitov. Mielodisplastični sindrom je kronična bolezen, kjer pride do izločanja številnih citokinov, ki motijo presnovo železa, vitaminov B12 in folne kisline, ob tem pa se, kot že rečeno, zaradi pogostih transfuzij, železo nepravilno nalaga v parenhimske organe in ne uporabi za sintezo hemoglobina.

Ugotovitve:

-Korelacija med MCV in CRP, kar potrjuje našo domnevo, da vplivajo vnetni citokini na spremembo MCV zaradi motenega metabolizma železa in vitaminov B skupine.



-Korelacija med transferinom – prenašalcem železa in hemoglobina. Predpostavka je, da pride do motene sinteze hemoglobina tudi zaradi zmanjšane prenosa železa po krvi in motene absorpcije železa iz prebavil.

-Korelacija med številom eritrocitov in hemoglobinom, ki je posledica zgoraj ugotovljenih sprememb.

-Tudi tukaj korelacije med feritinom in koncentracijo železa nismo našli, verjetno zaradi prisotnosti raznih vnetnih procesov.

Zaključujemo, da je določevanje serumskega železa pri tej skupini bolnikov neustrezno in nepotrebno, ker načeloma nizka koncentracija železa v plazmi, ne pomeni nujno že pomanjkanja. Zato je pri tej skupini bolj prikladno določevanje zalog železa - feritina.

## 7 Uporabljeni viri in literatura

Mikrocitna anemija, Wikipedia (svetovni splet), Dostopno na:

[http://sl.wikipedia.org/wiki/Mikrocitna\\_anemija](http://sl.wikipedia.org/wiki/Mikrocitna_anemija)

Moore G., Knight G., Blann A., Haematology, Oxford university press, 2010.

Bohinjec J, 1983. Temelji klinične hematologije, Dopolna delavska univerza Univerzum, Ljubljana, 11-293.

Eritrocit, Wikipedia (svetovni splet), Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Eritrocit>.

Černelč P., 1998. Opredelitev anemije, 9. Srečanje internistov in zdravnikov splošne medicine, Zbornik predavanj in praktikum, Splošna bolnišnica Maribor, 9-19

Laine F., Robert M., Lan CL et al. Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are decreased in HFE C282Y homozygote male iron overloaded patients. J Hepatol 2002; 36 (1):60-5

Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31 (10): 1111-37

Dautry-Varsat A. Receptor - mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. Biochemie 1986; 68: 375-81

Kocjančič Andreja, Mravlje F.: Interna medicina: DZS d.d. Ljubljana, 1998: 1038-1078.

Hepcidin, Wikipedia (svetovni splet), Dostopno na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hepcidin>.

Kranjc I., Pečovnik Balon B., 2000. Interna medicina za Visoko zdravstveno šolo, Maribor, 301-371.

Glaser M., Borin P., Grmek Zemljič T., 1998. Anemija zaradi pomanjkanja železa, 9. Srečanje internistov in zdravnikov splošne medicine, Zbornik predavanj in praktikum, Splošna bolnišnica Maribor, 23-34

Vloga serumskega transferrinskega receptorja pri diagnozi pomanjkanja železa (svetovni splet), Dostopno na:

<http://www.haematologica.org/cgi/reprint/83/10/958?maxtoshow=&hits=10&RESULTFOR MAT=&fulltext=serum+transferrin&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT>.

Hillman R.S., Ault K.A., Leporrier M., Rinder H.M., Haematology in clinical practice, New York 2011, 53-64.

Feritin, Wikipedia, (svetovni splet), Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Feritin>.

Anemije, Medicinska fakulteta, Slomškov trg 15, 2000 Maribor (svetovni splet), Dostopno na: <http://www.mf.uni-mb.si/slikeGradivo/Fiziologija07/Anemije.pdf>.

Mielodisplasticni sindrom (svetovni splet), Dostopno na: [http://www.limfomlevkemija.org/mielodisplasticni\\_sindrom/](http://www.limfomlevkemija.org/mielodisplasticni_sindrom/).

Myelodysplastic Syndromes Treatment, (svetovni splet), Dostopno na: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/myelodisplastic>.

Sysmex 2100 Xe (svetovni splet), Dostopno na: <http://www.sysmex.com/us/521.html>.

Pivk Breda, Vaje iz hematologije- delavni zvezek, Ljubljana 2007, 19-31.

Hematološke preiskave, UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij.

Določevanje številčne koncentracije eritrocitov v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT-1800i, UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM003, 1- 4.

Določevanje koncentracije hemoglobina v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT-1800i, UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM002, 1- 4.

Določevanje MCV v krvi na analizatorju Sysmex Xe- 2100 in Sysmex XT-1800i, UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP 75 SL HEM008, 1- 4.

Določevanje retikulocitov s supravitalnim barvanjem, UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Hematološki laboratorij, SP75 SL HEM019,1-4.

Retikulociti, (svetovni splet), Dostopno na: [http://www.poliklinika-stela.hr/Retikulociti\\_RTC.html](http://www.poliklinika-stela.hr/Retikulociti_RTC.html)

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

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

Kreatinin, (svetovni splet), Dostopno na: <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Kreatinin>

Merjenje kreatinina, (svetovni splet), Dostopno na: <http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/USF-KK-vaje-kreatinin.pdf>

CRP, (svetovni splet), Dostopno na: [http://www.dr-gorkic.si/pdf/CRP\\_konc.pdf](http://www.dr-gorkic.si/pdf/CRP_konc.pdf)

## 8 Priloge

### 8.1 Življenjepis



#### Europass življenjepis

#### Osebni podatki

Priimek / Ime	Anja NADELSBERGER
Naslov	Nova ulica 24, SI-2000 Maribor
Telefon	02 252 52 21                      Prenosni telefon:      040 396 867
E-pošta	anja@bodifit.net , <a href="mailto:anja.nadelsberger@gmail.com">anja.nadelsberger@gmail.com</a>

Državljanstvo	Slovensko
---------------	-----------

Datum rojstva	17.07.1986
---------------	------------

Spol	Ženski
------	--------

#### Izobraževanje                      in usposabljanje

Obdobje	Od septembra 2005 do junija 2011
---------	----------------------------------

Glavni predmeti / pridobljeno znanje in kompetence	Biokemija, mikrobiologija, molekularna biologija..
----------------------------------------------------	----------------------------------------------------

Naziv in status ustanove, ki je podelila diplomo, spričevalo ali certifikat	Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Smetanova ul. 17 SI- 2000 Maribor
-----------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

#### Znanja in kompetence

Materni jezik(i)	<b>Slovenski</b>
------------------	------------------

Drug(i) jezik(i)	<b>angleški, nemški</b>
------------------	-------------------------

Samovrednotenje	Razumevanje				Govorjenje				Pisanje	
	Slušno razumevanje		Bralno razumevanje		Govorno sporazumevanje		Govorno sporočanje			
<i>Evropska raven (*)</i>										
<b>Angleški jezik</b>	C1	Usposobljeni uporabnik	B2	Samostojni uporabnik	B2	Samostojni uporabnik	B2	Samostojni uporabnik	B2	Samostojni uporabnik
<b>Nemški jezik</b>	B1	Samostojni uporabnik	B1	Samostojni uporabnik	B1	Samostojni uporabnik	B1	Samostojni uporabnik	B2	Samostojni uporabnik

(\*) Skupni evropski referenčni okvir za jezike

Socialna znanja in kompetence	in	- smisel za skupinsko delo sem pridobila z večletnimi izkušnjami v športni organizaciji, kjer še vedno sodelujem kot strokovni delavec na področju skupinske vadbe- aerobike in pilatesa - tukaj sem še posebej razvila komunikacijske sposobnosti in javne nastope pred večjimi skupinami pri vodenju in predstavitvi raznih vadbenih zvrsti ali zadev, povezanih s športom
Organizacijska znanja in kompetence	in	- vodstvene sposobnosti (od septembra 2008 sem zadolžena za vodenje centra za skupinsko vadbo na OŠ Franca Rozmana Staneta) - smisel za organizacijo (kot administrativni sodelavec pri društvu Bodifit od leta 2005 do leta 2007)
Računalniška znanja in kompetence	in	- dobro poznavanje programa Microsoft Office™ (Word, Excel in PowerPoint); - osnovno poznavanje aplikacij za grafično oblikovanje
Vozniško dovoljenje		B kategorija

**Dosedanje  
izkušnje****delovne**

- julij, avgust 2005 - študentsko delo na Zavarovalnici Maribor
- september-december 2005 - študentsko delo na področju vina in vinske pridelave v laboratoriju družbe Vinag d.d.
- 2005-2007 - študentsko delo kot administrativni delavec na društvu Bodifit
- 2007-2009 - delo na društvu Bodifit kot strokovni sodelavec (vodenje skupinske vadbe-pilates, joga, aerobika, plesne ure...)
- julij, avgust, september 2008 - opravljanje prakse v Laboratoriju za genetiko in farmakogenomiko
- julij, avgust 2009 - delo v Agenciji Pinter (administrativno delo v špediciji)